

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**DÉVELOPPEMENT ET APPLICATION D'UN TEST ELISA POUR L'ÉTUDE
DES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE***

Par

Axelle BEAUDOIN

Département de microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie

Avril 2009

Évaluateurs (Université de Sherbrooke) :

Dr Eric Frost, Microbiologie et infectiologie

Directeur de recherche

Dre Sophie Michaud, Microbiologie et infectiologie

Directrice de recherche

Dr Louis-Charles Fortier, Microbiologie et infectiologie

Membre de jury interne

Dr Brian Talbot, Biologie

Membre de jury externe



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-53369-7
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-53369-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES TAMPONS ET DES MILIEUX.....	xiii
LISTE DES ANNEXES.....	xv
RÉSUMÉ.....	xvi
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Présentation.....	1
1.2 Survol épidémiologique.....	2
1.2.1 D’hier à aujourd’hui.....	2
1.2.2 Nouveaux défis.....	4
1.3 Facteurs de virulence.....	6
1.3.1 Généralités.....	6
1.3.2 Facteurs d’adhésion	7
1.3.3 Toxines A et B.....	9
1.3.3.1 Synthèse et régulation.....	9
1.3.3.2 Structure et mode d’action.....	12
1.3.3.3 Effets des toxines A et B	14
1.3.4 Toxine binaire.....	15
1.4 Maladie à <i>C. difficile</i>.....	17
1.4.1 Pathogenèse	17
1.4.2 Symptômes cliniques.....	17

1.4.3 Confirmation du diagnostic	18
1.4.4 Colonisation asymptomatique.....	19
1.4.5 Facteurs de risque.....	20
1.5. Traitement des infections	21
1.5.1 Premiers gestes	21
1.5.2 Antibiothérapie	22
1.5.3 Rechutes et réinfections	22
1.5.4 Développement de traitements alternatifs.....	23
1.6 Défenses naturelles de l'hôte	26
1.6.1 Réponse immunitaire innée	26
1.6.2 Flore normale intestinale	28
1.6.3 Propriétés chimiques et mécaniques du tube digestif	29
1.6.4 Réponse immunitaire acquise (production d'anticorps).....	29
1.6.5 Étude des anticorps dirigés contre <i>C. difficile</i> chez l'humain.....	31
1.6.6 Test ELISA	33
1.7 Objectifs du projet.....	34
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
2.1 Préparation des antigènes de capture	36
2.1.1 Purification des toxines A et B par chromatographie.....	36
2.1.2 Variation des conditions de production des toxines	38
2.1.3 Analyse des préparations de toxines	39
2.1.3.1 EIA commercial	39
2.1.3.2 Test de Bradford	39
2.1.3.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	40
2.1.3.4 Immunobuvardage western	41
2.1.4 Clonage du gène <i>cdtB</i> de la toxine binaire	42

2.1.4.1 Préparation des inserts	42
2.1.4.2 Préparation des vecteurs	44
2.1.4.3 Ligation	45
2.1.4.4 Transformation des cellules compétentes	45
2.1.4.5 Expression et purification des protéines recombinantes	47
2.1.5 Expression et purification de la protéine FliD	49
2.2 Échantillonnage des sérums	50
2.2.1 Étude A (sous la direction du Dre Vivian Loo).....	50
2.2.2 Étude B (sous la direction du Dr Louis Valiquette)	51
2.2.3 Entreposage et codage des sérums	52
2.3 Mise au point et application du test ELISA.....	52
2.3.1 Préparation d'un groupe contrôle (neutralisation de la cytotoxicité)	52
2.3.2 Antigènes utilisés dans l'ELISA	54
2.3.3 Ajustement des paramètres de l'ELISA	55
2.3.4 Protocole de l'ELISA.....	56
2.3.5 Valeur-seuil de positivité.....	57
2.3.6 Sensibilité, spécificité et reproductibilité de l'ELISA	57
2.3.7 Application du test ELISA et compilation des résultats	58
2.3.7.1 Antigènes utilisés, sélection des sérums et reprises.....	58
2.3.7.2 Contrôles positifs et négatifs	59
2.3.7.3 Soustraction du bruit de fond des sérums	59
2.3.7.4 Compilation et traitement des résultats	60
2.4 Validation de l'ELISA.....	60
2.5 Analyses statistiques.....	61
3. RÉSULTATS.....	62
3.1 Préparation des antigènes de capture	62

3.1.1 Purification des toxines A et B	62
3.1.2 Variation des conditions de production des toxines	63
3.1.3 Clonage du gène <i>cdtB</i> de la toxine binaire	64
3.1.4 Expression et purification de la protéine FltD	68
3.2 Mise au point et validation du test ELISA	70
3.2.1 Préparation d'un groupe contrôle.....	70
3.2.2 Ajustement des paramètres de l'ELISA	71
3.2.3 Sensibilité, spécificité et reproductibilité de l'ELISA	75
3.2.4 Validation du test ELISA	77
3.3 Résultats des tests ELISA sur les sérums de l'étude	78
3.3.1 Étude A	78
3.3.1.1 Distribution des patients.....	78
3.3.1.2 Résultats de l'ELISA.....	79
3.3.2 Étude B	85
3.3.2.1 Distribution des patients.....	85
3.3.2.2 Résultats de l'ELISA.....	87
4. DISCUSSION	93
4.1 Rappel des objectifs du projet	93
4.2 Choix et préparation des antigènes de capture	94
4.3 Mise au point et validation du test ELISA	98
4.4 Modèles proposés de la réponse humorale contre <i>C. difficile</i>	101
4.4.1 Étude A	101
4.4.2 Étude B	110
REMERCIEMENTS	119
BIBLIOGRAPHIE	120
ANNEXES	145

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Flagelles de <i>C. difficile</i>	8
Figure 2	Principe du test ELISA	33
Figure 3	Schéma des fragments clonés du gène <i>cdtB</i>	42
Figure 4	Purification des toxines à partir d'un surnageant de culture de <i>C. difficile</i>	62
Figure 5	Production d'un extrait de toxines concentré dans un tampon sans protéines.....	64
Figure 6	Comparaison des séquences en acides aminés des clones avec la séquence originale publiée	65
Figure 7	Production de la protéine recombinante BinII dans le vecteur pET-39b(+)	66
Figure 8	Production des protéines recombinantes BinI, BinII et BinIII.....	67
Figure 9	Purification des protéines clonées sur résine de nickel.....	68
Figure 10	Purification de la protéine FliD sur résine Glutathione Sepharose	69
Figure 11	Résultats du test de neutralisation de la cytotoxicité sur cellules MRC-5.....	70
Figure 12	Résultats des tests ELISA (DO ₄₅₀₋₆₃₀) pour 8 sérums du groupe contrôle en fonction de la concentration de l'antigène de capture rTcdB	71
Figure 13	Résultats des tests ELISA (DO ₄₅₀₋₆₃₀) pour 8 sérums du groupe contrôle en fonction de la concentration du sérum	72
Figure 14	Résultat des tests ELISA (DO ₄₅₀₋₆₃₀) pour 32 sérums du groupe contrôle selon le bloqueur utilisé	73
Figure 15	Bruit de fond de l'ELISA (DO ₄₅₀₋₆₃₀) en fonction du temps de blocage avec un tampon 3% BSA pour 7 sérums du groupe contrôle	74

Figure 16	Mesure du bruit de fond ($DO_{450-630}$) en absence d'antigène de capture et en présence de 1µg/ml rTcdB pour 15 sérums du groupe contrôle.....	75
Figure 17	Distribution des résultats de l'ELISA des patients de l'étude A par site...	80
Figure 18	Taux de prévalence des colonisations et des infections dans l'étude A	104
Figure 19	Modèle proposé selon les résultats de l'étude A.....	107
Figure 20	Adhésion de <i>C. difficile</i> aux microvillosités	109
Figure 21	Modèle proposé selon les résultats de l'étude B.....	116
Figure A1	Séquence du gène de la toxine binaire et positionnement des amorces pour l'amplification PCR	146
Figure A2	Carte du vecteur pET-20b(+)	149
Figure A3	Carte du vecteur pET-39b(+)	150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Séquences des amorces utilisées pour l'amplification PCR du gène <i>cdtB</i>	43
Tableau 2	Conditions d'ajustement des paramètres du test ELISA	55
Tableau 3	Concentration des antigènes de capture utilisés dans le test ELISA	56
Tableau 4	Distribution des résultats des tests ELISA pour l'anticorps anti-rTcdB réalisés en triplicatas durant 4 jours sur 21 sérums du groupe contrôle	76
Tableau 5	Distribution des résultats des tests ELISA réalisés en triplicatas durant 4 jours sur 11 sérums inconnus.....	77
Tableau 6	Corrélations entre les résultats du test de neutralisation de la cytotoxicité et l'ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre rTcdB, TcdB et iTcdB lors de la validation du test	78
Tableau 7	Distribution des résultats de l'ELISA des patients de l'étude A par site ..	79
Tableau 8	Distribution des résultats de l'ELISA du sérum prélevé à l'admission en fonction du statut des patients	81
Tableau 9	Taux de séroconversion en fonction du statut des patients	82
Tableau 10	Séropositivité en fonction du pulsovar chez les porteurs d'une souche ..	83
Tableau 11	Taux de séroconversion en fonction du pulsovar chez les patients qui sont devenus colonisés ou infectés pendant l'étude.....	84
Tableau 12	Taux de séroconversion en fonction du titre de cytotoxines chez les patients qui sont devenus colonisés ou infectés pendant l'étude	85
Tableau 13	Distribution des patients de l'étude B aux jours 1 et 21 selon les sérums disponibles et la présence ou non d'une souche de <i>C. difficile</i>	86

Tableau 14	Distribution des patients de l'étude B aux jours 1 et 21 selon les sérums disponibles et la survenue ou non d'épisode(s) de rechute.....	87
Tableau 15	Distribution des séropositifs chez les patients porteurs d'une souche	88
Tableau 16	Distribution des séropositifs au jour 1 chez les patients du groupe I selon la survenue ou non de complications.....	89
Tableau 17	Distribution des séropositifs au jour 21 chez les patients porteurs d'une souche selon la survenue ou non de rechutes.....	90
Tableau 18	Taux de séroconversion selon la survenue ou non de complications et/ou de rechutes	91
Tableau A1	Séquences des amorces utilisées pour la détection des produits de ligation.....	152

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	Degré celcius
2XYT	<i>2X Concentrated Yeast extract and Tryptone</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCFA	<i>Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar</i>
CDTLoc	Locus du gène <i>cdt</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CROPs	<i>Clostridial Repetitive Oligopeptides</i>
DACD	Diarrhée associée à <i>C. difficile</i>
DMEM	<i>Dubelco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Déoxyribonucleotides
DO	Densité Optique
DO ₆₀₀	Densité Optique à une longueur d'onde de 600 nanomètres
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tetraacétique
EIA	<i>Enzyme ImmunoAssay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FF	<i>FastFlow</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GST	Glutathione-S-Transférase
GTP	Guanosine triphosphate

Ig	Immunoglobuline
iTcdA	Toxoïde A (toxine A inactivée)
iTcdB	Toxoïde B (toxine B inactivée)
IPPs	Inhibiteurs de la pompe à protons
IPTG	Isopropyl-beta-thio-galactoside
Ivlg	<i>Intravenous Immunoglobulin</i>
His	Histidine
kDa	Kilodaltons
LB	<i>Luria-Bertani Broth</i>
LCT	<i>Large Clostridial Toxins</i>
LPS	Lipopolysaccharides
M	Molaire
ND	Non disponible
NCNC	Ni cas ni colonisés
NK	<i>Natural Killer</i>
PaLoc	Locus de pathogénicité
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
pH	Potentiel hydrogène
plgR	Récepteur des immunoglobulines polymériques
PMSF	Phenylmethanesulphonylfluoride
PPs	Plaques de Payer
PRRs	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
p/v	poids/volume

rTcdA	Toxine A recombinante (fragment C-terminal)
rTcdB	Toxine B recombinante (fragment C-terminal)
SIAM	Système Immunitaire Associé aux Muqueuses
SLPs	<i>Surface-Layer Proteins</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TSB	<i>Tryptone Soya Broth</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TMB	Tetramethylbenzidine
TcdA	Toxine A
TcdB	Toxine B
TP	Température pièce (environ 23°C)
U	Unités
V	Volts
v/v	volume/volume

LISTE DES TAMPONS ET DES MILIEUX

Bleu de Coomassie	50% (v/v) méthanol, 7% (v/v) acide acétique, 0,2% (p/v) bleu de Coomassie
Milieu 2XYT	1,6% (p/v) Bacto-Tryptone, 1,0% (p/v) Yeast Extract, 0,5% (p/v) NaCl
Milieu LB	1,0% (p/v) Bacto-Tryptone, 0,5% (p/v) Yeast Extract, 1,0% (p/v) NaCl
PBS pH 7,4	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,9 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl
Solution A	20 mM Tris-HCl pH 7,5
Solution B	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl
Solution d'argent	18,9 mM NaOH, 1,4% (v/v) NH ₄ OH, 0,8% (v/v) AgNO ₃
Solution de révélation	0,005% (v/v) acide citrique, 0,019% (v/v) formaldéhyde
Tampon d'échantillon 3X	150 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% (p/v) SDS, 0,3% (p/v) bleu de bromophenol, 30% (v/v) glycérol, 5% (v/v) β-mercaptoethanol
Tampon d'électrophorèse	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS
Tampon d'élution	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole
Tampon d'extraction	30 mM Tris-HCl pH 8,0, 20% (p/v) sucrose, 1 mM EDTA pH 8,0
Tampon de blocage	TBS-T, 5% (p/v) lait écrémé en poudre
Tampon de clivage	50 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Tampon de colonne	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole
Tampon de décoloration	50% (v/v) méthanol, 7% (v/v) acide acétique
Tampon de dilution	TBS-T, 1% (p/v) lait écrémé en poudre

Tampon de lavage	TBS, 0,05% (v/v) Tween 20 (TBS-T)
Tampon de liaison	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole
Tampon de ligation	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA
Tampon de transfert	25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) méthanol
Tampon glutathione réduite	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM glutathione réduite
Tampon urée	100 mM Tris-HCl pH 8,3, 8 M urée
TBS pH 7,0	50 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Séquence du gène de la toxine binaire et amorces	145
Annexe B	Cartes des vecteurs utilisés (pET-20b(+) et pET-39b(+))	148
Annexe C	Protocole du PCR pour la détection des produits de ligation	151

RÉSUMÉ

Développement et application d'un test ELISA pour l'étude des anticorps dirigés contre *Clostridium difficile*, Mémoire de maîtrise présenté par Axelle Beaudoin, Département de microbiologie et infectiologie, Université de Sherbrooke, Avril 2009.

Clostridium difficile est un pathogène entérique pouvant causer des diarrhées allant de modérées à sévères, des colites pseudomembraneuses et même la mort. Les traitements actuels contre la bactérie ont des taux de rechutes élevés. De plus, il n'existe pas à ce jour de vaccin permettant de prévenir l'infection. Cette étude épidémiologique porte sur la protection contre la colonisation et/ou la maladie conférée par la présence d'anticorps sériques naturels spécifiques aux antigènes de la bactérie. Nous avons développé un test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) pour la détection des anticorps contre les toxines A et B de *C. difficile* et contre les protéines du flagelle (flagellines) dans des échantillons de sérum. Notre test ELISA servant à détecter les anticorps dirigés contre la toxine B a été calibré de façon à obtenir la meilleure corrélation possible avec le test de neutralisation de la cytotoxicité de la toxine B. Les paramètres du test ELISA ainsi mis au point ont été appliqués aux autres antigènes (toxine A et flagellines), pour lesquels un test de référence n'existe pas.

Par la suite, nous avons tenté de définir le rôle de la réponse immunitaire humorale de l'hôte en corrélant les résultats de l'analyse des sérums de deux groupes de patients hospitalisés avec les informations sur le suivi des symptômes et la recherche de la présence de la bactérie dans les selles. Le premier groupe de patients nous a permis d'étudier la relation entre la survenue de la colonisation ou de l'infection par *C. difficile* et la production d'anticorps. Nos résultats montrent que les anticorps sériques

ne semblent pas protéger le patient de l'implantation de la bactérie au tube digestif mais que suite à l'infection, une réponse humorale est mise en place contre les toxines du pathogène. Les patients du deuxième groupe, des patients hospitalisés infectés par *C. difficile*, ont été surveillés pour la survenue de symptômes sévères, du décès ou de rechutes suite à un épisode de maladie. Nous avons observé une plus grande prévalence d'anticorps sériques dirigés contre la toxine B et contre certaines flagellines chez les patients ayant eu une infection simple, sans complications ni rechutes.

Les résultats de nos travaux indiquent donc que certains patients développent une réponse humorale contre les antigènes de *C. difficile* et que les anticorps produits, particulièrement ceux dirigés contre la toxine B, semblent impliqués dans la défense du patient contre la survenue de complications et de rechutes. Nos données laissent toutefois sous-entendre que d'autres caractéristiques de l'hôte contribuent de façon importante à la défense contre la colonisation et l'infection par *C. difficile*. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de définir les paramètres qui permettront d'élaborer un protocole de vaccination optimal contre *C. difficile*.

MOTS CLÉS : *Clostridium difficile*, ELISA, toxines, réponse humorale, protection.

1. INTRODUCTION

1.1 Présentation

Bien avant l'avènement de la médecine moderne et des traitements aux antibiotiques, l'unique arme dont disposait l'homme pour se débarrasser d'une infection microbienne était son système immunitaire. Encore aujourd'hui, les individus atteints d'infections bactériennes ou virales mineures se voient prescrire... de grands verres d'eau et beaucoup de repos! Les défenses naturelles du corps humain suffisent généralement à enrayer la majorité des infections les plus communes. Pour les infections coriaces, la médecine propose maintenant différentes thérapies servant à compléter, améliorer ou même remplacer l'immunité naturelle. Des infections historiquement mortelles sont aujourd'hui traitées et guéries en quelques semaines, voire quelques jours, ou encore évitées grâce aux vaccins.

Malheureusement, certains traitements ne font pas que résoudre les problèmes : ils en créent de nouveaux. Depuis la découverte des agents antibactériens, l'augmentation fulgurante de la résistance chez les bactéries fait craindre le pire. De plus en plus d'infections deviennent difficiles à traiter et la transmission entre les individus, passant parfois par des réservoirs animaux, est facilitée. L'utilisation d'antibiotiques, paradoxalement, est aussi une cause bien documentée d'infections opportunistes. Beaucoup d'antibiotiques ciblent un spectre très large de microorganismes. Ainsi, en plus de neutraliser le pathogène responsable de l'infection, l'antibiotique affecte la flore normale protectrice de l'individu et le fragilise à la colonisation par d'autres microorganismes.

Clostridium difficile est un de ces pathogènes opportunistes qui profitent de l'affaiblissement de la flore normale suite à un traitement antibiotique pour coloniser le tube digestif des patients hospitalisés et y produire des toxines puissantes. Souvent retrouvée en milieu hospitalier, *C. difficile* est une bactérie redoutable dont le traitement par des antibiotiques est compliqué par le risque de créer ou d'augmenter une résistance chez d'autres pathogènes. De plus, les taux de rechutes de la maladie à *C. difficile* sont très élevés. Aucun vaccin humain n'est disponible à ce jour contre la bactérie et des hôpitaux de partout dans le monde sont aux prises avec des foyers d'infection qui laissent derrière de nombreux morts. L'émergence de nouvelles souches hypervirulentes, dont la souche BI/NAP1/027, semble en partie responsable des changements épidémiologiques observés ces dernières années.

1.2 Survol épidémiologique

1.2.1 D'hier à aujourd'hui

Clostridium difficile, ou *Bacillus difficile*, a été isolé de la flore normale de nouveau-nés en santé et caractérisé pour la première fois en 1935 par Hall et O'Toole (GEORGE *et al.*, 1979a, BARTLETT, 2007). Il a fallu attendre jusqu'à la fin des années 1970 pour que la bactérie soit identifiée comme étant la principale responsable des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques et des colites pseudomembraneuses (GEORGE, 1980, RILEY, 2004, BARTLETT, 2006). Depuis le début du XXI^e siècle, l'augmentation à l'échelle mondiale de la fréquence et de la sévérité des infections à *C. difficile* a contribué à définir de nouvelles priorités de recherche concernant la bactérie et ses facteurs de virulence, les différentes présentations cliniques de la maladie ainsi que la prévention et le traitement des infections.

Les premières éclosions massives d'infections à *C. difficile* sont survenues dans plus de 30 hôpitaux des régions de Montréal et de Sherbrooke, au Québec, en 2003 (PÉPIN *et al.*, 2004, LOO *et al.*, 2005). En tout, près de 14 000 cas d'infection ont été rapportés. Aux États-Unis, c'est une augmentation de 117% des cas de diarrhées associées à *C. difficile* (DACD) qui a été observée entre 2000 et 2005. La mortalité relative aux DACD a également pris de l'ampleur durant cette période (de 1,2% en 2000 à 2,2% en 2004) (ZILBERBERG *et al.*, 2008). L'Angleterre, les Pays-Bas, la Belgique et la France ont également été aux prises avec des épidémies importantes associées à *C. difficile* depuis les dernières années (KUIJPER *et al.*, 2006).

Le typage des souches isolées lors de ces éclosions a permis de démontrer la prédominance d'un clone hypervirulent de *C. difficile* (HUBERT *et al.*, 2007). Cette souche historiquement rare de toxinotype III appartient au groupe BI par digestion avec des endonucléases de restriction, présente le profil d'électrophorèse en champ pulsé type 1 (*North American Pulse Field type 1* ou NAP1, identique au pulsovar A) et est de ribotype 027 (BI/NAP1/027). Elle produit une plus grande quantité de toxines A et B que les souches historiques de toxinotype 0, possède une troisième toxine, la toxine binaire, et présente une résistance accrue aux fluoroquinolones (WARNY *et al.*, 2005). En plus d'être largement retrouvé en Amérique du Nord (MCDONALD *et al.*, 2005), le clone BI/NAP1/027 a été associé à des augmentations importantes du taux de prévalence des infections à *C. difficile* dans plusieurs pays d'Europe et a même été isolé dans des hôpitaux japonais (KUIJPER *et al.*, 2007). Bien que certains auteurs remettent en question la virulence accrue des souches BI/NAP1/027 (MORGAN *et al.*, 2008), plusieurs études leur associent un risque plus élevé de développer une forme sévère de la maladie (HUBERT *et al.*, 2007, BARBUT *et al.*, 2007).

À ce jour, *C. difficile* est le microorganisme responsable de 15% à 25% des diarrhées infectieuses associées aux antibiotiques et la cause principale de colites pseudomembraneuses chez les patients hospitalisés des pays développés (CONLY, 2000, BARTLETT et GERDING, 2008b). Parmi les autres bactéries pouvant causer des diarrhées associées aux antibiotiques, on retrouve *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (ACKERMANN *et al.*, 2005), *Salmonella spp.* et *Klebsiella oxytoca* (BARTLETT et GERDING, 2008b).

1.2.2 Nouveaux défis

Selon les données publiées par l'Institut National de Santé Publique du Québec en 2008 (INSPQ, 2008), les taux d'incidence et de mortalité associés aux infections à *C. difficile* dans la province de Québec sont en diminution depuis 2004. Il est toutefois primordial de demeurer vigilants puisque beaucoup de changements se dessinent dans le portrait épidémiologique des infections à *C. difficile* depuis les dernières années.

Tout d'abord, le caractère presque exclusivement nosocomial des infections à *C. difficile* a été remis en question. Plusieurs études, dont certaines très récentes, ont évalué l'importance épidémiologique relative des cas acquis dans la communauté. Ainsi, Barbut *et al.* (BARBUT *et al.*, 1996), ont remarqué lors de leur étude sur la prévalence de *C. difficile* dans les selles deux périodes où l'isolement de la bactérie était le plus fréquent : dans les 24 heures suivant l'admission à l'hôpital et après le septième jour d'hospitalisation. Ces données suggèrent fortement qu'une proportion non-négligeable de diarrhées associées à *C. difficile* survient en dehors du contexte hospitalier. L'étude de Bauer (BAUER *et al.*, 2008) rapporte un cas acquis dans la communauté qui ne serait pas relié à la prise d'antibiotiques ainsi qu'un cas qui témoigne de la facilité de la

dissémination dans la communauté d'une souche acquise en milieu hospitalier. Le nombre de souches en circulation, la prévalence des porteurs asymptomatiques, la présence de réservoirs animaux (ARROYO *et al.*, 2005) ainsi que la contamination de la nourriture (RODRIGUEZ-PALACIOS *et al.*, 2007) sont des facteurs potentiels contribuant à l'augmentation des cas d'infections à *C. difficile* acquis dans la communauté.

Par ailleurs, d'autres populations auparavant peu à risque d'infection par la bactérie sont désormais touchées par la maladie. Plusieurs cas de diarrhées à *C. difficile* acquis par des patientes péripartum ont été recensés dans quatre états américains entre 2003 et 2005 dans un rapport des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2005). Un nombre croissant d'enfants infectés par la bactérie a également été rapporté récemment dans la littérature. Aux États-Unis, les taux de prévalence de la maladie chez les enfants sont passés de 2,6 à 4,0 cas par 1000 admissions entre 2000 et 2006 (KIM *et al.*, 2008). De plus, une analyse rétrospective des 200 cas d'infection à *C. difficile* survenus entre 2000 et 2003 dans un hôpital canadien pour enfants a permis de constater que 31% des jeunes patients traités contre la bactérie avaient eu au moins un épisode de rechute (MORINVILLE et MCDONALD, 2005).

Enfin, la prévalence chez l'humain d'une nouvelle souche hypervirulente de *C. difficile*, le ribotype 078 (toxinotype V), augmente rapidement depuis 2003 (RUPNIK *et al.*, 2008b). La sévérité des symptômes associés à l'infection par les souches de ribotype 078 ainsi que les taux de mortalité sont comparables à ceux des souches de ribotype 027 (GOORHUIS *et al.*, 2008). Ces souches affectent cependant une population significativement plus jeune et seraient plus fréquemment associées à des infections acquises dans la communauté. De plus, les souches de ribotype 078 sont les principales

souches isolées chez les veaux et les cochonnets (KEEL *et al.*, 2007). L'existence de réservoirs animaux pour des souches pathogènes humaines représente une menace importante et confirme la nécessité de disposer de moyens pour prévenir et traiter la contamination.

1.3 Facteurs de virulence

1.3.1 Généralités

C. difficile est une bactérie anaérobie stricte sporulante. Sous sa forme végétative, la bactérie possède une paroi Gram positif alors que sa spore, subterminale non-déformante, est Gram négatif. L'isolement sélectif et différentiel de *C. difficile* est effectué sur le milieu de culture CCFA (composé de cyclosérine, céfoxitine, fructose et jaune d'œuf) développé par George *et al.* en 1979 (GEORGE *et al.*, 1979b). Les colonies cultivées sur ce type de milieu pendant 48 heures en anaérobiose sont plates, jaunâtres, ont un pourtour circulaire à irrégulier (KNOOP *et al.*, 1993) et présentent une odeur caractéristique de fumier de cheval (DELMÉE, 2001).

Certaines souches de *C. difficile* sont pathogènes pour l'homme de même que pour le chien, le chat, le cheval et le porc. Le lapin, l'autruche et même l'éléphant peuvent également développer des diarrhées associées à *C. difficile* (ARROYO *et al.*, 2005, BOJESSEN *et al.*, 2006). L'arsenal impressionnant de facteurs de virulence que possède *C. difficile* ainsi que sa capacité à former des spores hautement résistantes lui permettent de survivre et de se multiplier dans des environnements complexes. En effet, *C. difficile* dispose de facteurs d'adhésion servant entre autres à l'implantation au tube digestif, à la chimotaxie et à la motilité, d'une capsule lui permettant de résister à la

phagocytose ainsi que de plusieurs enzymes hydrolytiques (rapporté par BORRIELLO, 1998). Toutefois, le potentiel pathogène d'une souche est lié à sa capacité à produire des exotoxines puissantes : la toxine A (TcdA) et/ou la toxine B (TcdB) (POTHOULAKIS et LAMONT, 2001, GIESEMANN, 2008).

1.3.2 Facteurs d'adhésion

La capacité à lier de façon stable les surfaces de l'hôte influence la virulence de plusieurs pathogènes entériques, dont *Helicobacter pylori* (CLYNE et DRUMM, 1997), *Escherichia coli* (LE BOUQUÉNEC, 2005) ou encore *Yersinia enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* (ELLISON *et al.*, 2004). Dans le cas de *C. difficile*, l'adhésion de la bactérie à la muqueuse intestinale est préalable à la colonisation du tube digestif et à la production des toxines (CALABI *et al.*, 2002). Plusieurs protéines d'adhésion (adhésines) sont produites par *C. difficile*. Tout d'abord, deux protéines fortement antigéniques forment la surface la plus externe de la bactérie (couche S) et sont entre autre impliquées dans les contacts entre le pathogène et l'hôte lors de la colonisation (CERQUETTI *et al.*, 2000, DRUDY *et al.*, 2004, QAZI *et al.*, 2008). Les travaux de Calabi *et al.* (CALABI *et al.*, 2002) ont démontré la liaison de ces protéines de surface (SLPs) aux tissus gastrointestinaux humains et murins, aux cellules épithéliales humaines ainsi qu'à certains composants de la matrice extracellulaire (collagène type I, thrombospondine et vitronectine). Les protéines de la paroi cellulaire Cwp66 et Cwp84 (WALIGORA *et al.*, 2001, PÉCHINÉ *et al.*, 2005a, JANOIR *et al.*, 2007) de même que GroEL (HENNEQUIN *et al.*, 2001) et Fbp68 (HENNEQUIN *et al.*, 2003) sont également des adhésines majeures de *C. difficile*.

De plus, les souches de *C. difficile* appartenant aux sérogroupes A, D, G, H et K (DELMÉE *et al.*, 1990) possèdent des flagelles péritriches (Figure 1). Les flagelles bactériens sont des facteurs de virulence importants : ils peuvent servir à la motilité et la chimotaxie, à l'adhérence à certaines structures ou encore à l'invasion des surfaces et des muqueuses de l'hôte (RAMOS *et al.*, 2004). La majorité des travaux visant à élucider la structure du flagelle ont été réalisés sur *Salmonella typhimurium*. Le flagelle est composé d'un élément moteur, d'un crochet, d'un filament et d'une structure coiffante à son extrémité (IKEDA *et al.*, 1996, YONEKURA *et al.*, 2002). Chez *C. difficile*, les flagellines FliC formant le filament et la protéine de coiffe FliD ont été étudiées pour leur implication lors de la colonisation du tube digestif de l'hôte (TASTÉYRE *et al.*, 2001b). Bien que les protéines recombinantes FliC et FliD puissent lier du mucus d'origine murine immobilisé sur un support, seulement FliD adhère à des cellules Vero en culture. Ces résultats mettent en évidence la présence probable de récepteurs muqueux du flagelle ainsi que la capacité de *C. difficile* à adhérer aux cellules via l'extrémité distale de ses flagelles. Contrairement à FliC, dont le gène présente un grand polymorphisme entre les souches (TASTÉYRE *et al.*, 2000), le gène codant pour la protéine FliD est très bien conservé (TASTÉYRE *et al.*, 2001a). Cette conservation dans la séquence pourrait attester du rôle crucial de FliD lors de la pathogenèse. De plus, le groupe de Péchiné (PÉCHINÉ *et al.*, 2007) a démontré que l'immunisation de souris avec des préparations de flagelles et de protéines de surface de *C. difficile* permettait de diminuer de façon significative les taux de colonisation par la bactérie.



Figure 1. Flagelles de *C. difficile*

Source : DELMÉE *et al.*, 1990

1.3.3 Toxines A et B

1.3.3.1 Synthèse et régulation

Les gènes codant pour les toxines A et B de *C. difficile* (*tcdA* et *tcdB*) se situent dans une région bien caractérisée du chromosome de la bactérie : le locus de pathogénicité (PaLoc). Le PaLoc s'étend sur 19,6 kb et on y retrouve également trois gènes accessoires (*tcdC*, *tcdR*, *tcdE*) associés à la régulation de l'expression des toxines. Les gènes du locus de pathogénicité, à l'exception du gène *tcdC*, sont orientés dans le même sens et transcrits de façon monocistronique et polycistronique. Ils possèdent tous leur propre promoteur actif (HUNDSBERGER *et al.*, 1997). Les souches dont le PaLoc est remplacé par une séquence de 115 pb d'ADN ne sont pas virulentes (BRAUN *et al.*, 1996, COHEN *et al.*, 2000).

De nombreuses variations dans la séquence du PaLoc ont été identifiées. Ces variations permettent de classifier les isolats selon leur appartenance à un *toxintype*. Le toxintypage des souches (détection des insertions, des délétions et des mutations ponctuelles) est effectué à l'aide d'une méthode de PCR-RFLP élaborée par Rupnik *et al.* (RUPNIK *et al.*, 1998). À ce jour, 24 toxintypes variants (I à XXIV) ont été répertoriés, en plus du toxintype 0 dont le profil de restriction du PaLoc est identique à celui de la souche de référence VPI10463 (RUPNIK, 2008a). Chaque toxintype présente un profil d'expression protéique particulier au niveau de la taille des toxines, de leur potentiel enzymatique ou encore de la nature de leurs interactions avec les différentes cibles cellulaires. Par exemple, les représentants des toxintypes VIII, X, XVI et XVII possèdent une forme tronquée du gène *tcdA* ainsi qu'un gène *tcdB* complet. Bien que les souches appartenant à ces toxintypes ne produisent que la toxine B (A

B⁺), elles sont pathogènes pour l'humain, entraînent les mêmes symptômes que l'infection par les souches produisant les 2 toxines (A⁺B⁺) (TOYOKAWA *et al.*, 2003, DRUDY *et al.*, 2007) et ont été impliquées dans plusieurs éclosions (ALFA *et al.*, 2000, KUIJPER *et al.*, 2001, KOMATSU *et al.*, 2003).

Au niveau moléculaire, trois gènes situés sur le PaLoc (*tcdC*, *tcdR* et *tcdE*) codent pour des protéines qui modulent l'expression des toxines A et B. D'abord, la protéine TcdR (ou TcdD ou TxeR) régule positivement la transcription des gènes des toxines et est exprimée vers la fin de la phase de croissance exponentielle et durant la phase stationnaire. Il s'agit d'un facteur σ alternatif qui se couple à l'ARN polymérase pour générer une holoenzyme fonctionnelle possédant une affinité pour les promoteurs des gènes des toxines (MANI et DUPUY, 2001). La ressemblance de structure et de fonction de la protéine TcdE avec les holines des bactériophages permettent de poser certaines hypothèses sur son mode d'action (TAN *et al.*, 2005). Hautement hydrophobe, TcdE serait associée à la sécrétion des toxines dans l'environnement grâce à son potentiel de perméabilisation de la membrane cytoplasmique. Cette fonction est capitale puisque les toxines A et B ne possèdent aucune séquence signal dirigeant leur excrétion à l'extérieur de la cellule. Enfin, le produit du gène *tcdC* est un inhibiteur de l'expression des toxines A et B. C'est un anti-facteur σ qui interfère dans la liaison du facteur σ TcdR avec l'ARN polymérase. TcdC déstabilise la liaison de l'holoenzyme fonctionnelle (composée du noyau de la polymérase et de son facteur σ) sur son promoteur, retardant ainsi la transcription des gènes des toxines et leur expression. (MATAMOUROS *et al.*, 2007, DUPUY *et al.*, 2008) Le gène *tcdC*, dont l'orientation est opposée à celle des autres gènes du PaLoc, est exprimé uniquement lors de la phase de croissance exponentielle de la bactérie.

Les variations polymorphiques du gène *tcdC* (SPIGAGLIA et MASTRANTONIO, 2002, STARE *et al.*, 2007) entraînent parfois l'expression d'isoformes plus ou moins tronqués de la protéine. Le rôle fonctionnel de la plupart de ces isoformes demeure généralement intact. Toutefois, certaines souches de *C. difficile* – les clones épidémiques hypervirulents BI/NAP1/027, par exemple – possèdent dans le gène *tcdC* une délétion de 18 pb (Δ 330-347) associée à une délétion d'une seule paire de bases (Δ 117). La délétion en position 117 cause un décalage du cadre de lecture qui entraîne une troncature de la protéine régulatrice. La protéine produite par ces souches est composée de 65 acides aminés seulement, dont 34% sont transcrits à partir d'un cadre de lecture décalé (MACCANNELL *et al.*, 2006). En raison de l'absence d'un régulateur négatif fonctionnel, la production des toxines chez les souches possédant la mutation en position 117 s'effectue plus tôt lors de la croissance de la bactérie (dès le début de la phase logarithmique) et en plus grande quantité (WARNY *et al.*, 2005).

La synthèse et l'expression de TcdA et TcdB *in vitro* sont régulées selon les phases de croissance de *C. difficile*. Durant la phase exponentielle, la production des toxines est réprimée pour ensuite être fortement augmentée pendant la phase stationnaire. Plusieurs conditions environnementales telles que la disponibilité des nutriments dans le milieu de culture, la température de croissance, la présence d'acides aminés soufrés (méthionine, cystéine), d'acide butyrique, de butanol ou de sources de carbone rapidement métabolisées influencent les taux de production des toxines (HASLAM *et al.*, 1986, OSGOOD *et al.*, 1993, MATAMOUROS *et al.*, 2007, DUPUY *et al.*, 2008). En plus des conditions du milieu, certaines caractéristiques intrinsèques à la bactérie (séro groupe, composition protéique de la paroi, etc) de même que des facteurs de l'hôte comme la composition de la flore normale ou la présence au colon d'enzymes et de nutriments peuvent avoir un effet sur la production des toxines *in vivo* (ÅKERLUND

et al., 2006). Enfin, le stress et des concentrations sous-inhibitrices de certains antibiotiques modulent aussi la production des toxines (ONDERDONK *et al.*, 1979, VOTH et BALLARD, 2005).

1.3.3.2 Structure et mode d'action

Les protéines TcdA et TcdB appartiennent à la famille des *Large Clostridial Toxins* (LCT). Les toxines de cette famille causent plusieurs syndromes cliniques sévères, dont la colite pseudomembraneuse ou encore la gangrène gazeuse. En plus des toxines A et B de *C. difficile*, on retrouve parmi les LCT la toxine létale (TcsL) et la toxine hémorragique (TcsH) de *C. sordellii* ainsi que la toxine α (Tcn α) de *C. novyi* (JUST et GERHARD, 2004, VOTH et BALLARD, 2005). Les LCT possèdent plusieurs caractéristiques structurales et fonctionnelles communes. Ce sont des protéines de haut poids moléculaire (250 à 308 kDa) constituées d'une seule chaîne d'acides aminés dont les homologies vont de 36% à 90%. Bien que leurs effets *in vivo* diffèrent, les LCT présentent toutes un effet sur le cytosquelette d'actine des lignées cellulaires *in vitro*. Elles ont pour substrats les petites protéines des familles de GTPases Rho et Ras (SCHIRMER et AKTORIES, 2004). Les protéines TcdA et TcdB ainsi que les autres LCT sont formées de trois domaines fonctionnels distincts : un domaine de liaison au récepteur cellulaire à l'extrémité C-terminale, une région centrale hydrophobe servant à la translocation membranaire ainsi qu'un domaine catalytique en N-terminal (JUST et GERHARD, 2004).

La liaison des toxines au récepteur spécifique des cellules-cibles s'effectue via le domaine C-terminal. Cette portion de la toxine comporte des séquences répétitives de 21, 30 ou 50 acides aminés (CROPs : *clostridial repetitive oligopeptides*) comprenant de

14 à 30 motifs consensus YYF (SCHIRMER et AKTORIES, 2004, JANK *et al.*, 2007, YEH *et al.*, 2008). L'activité de la toxine A *in vitro* et *in vivo* peut être neutralisée par des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine de liaison au récepteur (SAUERBORN *et al.*, 1997). De plus, des fragments de la portion C-terminale de TcdA produits sous forme de protéines recombinantes peuvent compétitionner avec la toxine A native pour lier les récepteurs présents à la surface de cellules en culture et prévenir l'effet cytotoxique (SAUERBORN *et al.*, 1997, DINGLE *et al.*, 2008). Le domaine C-terminal est également un activateur de l'inflammation : sa liaison avec les cellules épithéliales induit la production de chémokines et de molécules d'adhésion ayant un rôle important dans la migration et l'infiltration des leucocytes (YEH *et al.*, 2008). Bien que la nature exacte des ligands cellulaires du domaine C-terminal demeure méconnue, la susceptibilité d'une grande variété de lignées cellulaires à l'intoxication par *C. difficile* témoigne de l'ubiquité des récepteurs des toxines (VOTH et BALLARD, 2005).

La partie centrale des toxines A et B, encore très peu caractérisée, couvre plus de 50% de la totalité de la protéine et comporte une courte séquence hydrophobe. Cette portion des toxines sert à la translocation du domaine enzymatique vers le cytosol de la cellule-cible. Son rôle est essentiel puisque sa délétion entraîne une diminution, voire même une perte, de la cytotoxicité (GIESEMAN, 2008). Ce sont les 543 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale qui forment la portion biologiquement active des toxines. Les toxines A et B ont entre elles 74% d'homologie au niveau de cette région enzymatique, ce qui explique la similarité de leurs substrats (VOTH et BALLARD, 2005).

L'interaction de la portion C-terminale avec le récepteur cellulaire permet l'internalisation des toxines dans la cellule-cible via la formation d'une vésicule

endocytaire. L'environnement acide de l'endosome modifie la conformation du domaine de translocation membranaire hydrophobe de la toxine et permet son insertion dans la membrane vésiculaire (JANK *et al.*, 2007). Le domaine enzymatique est alors exposé au cytosol et son clivage, catalysé par les inositolphosphates de l'hôte (REINEKE *et al.*, 2007), permet la libération d'une enzyme fonctionnelle (PFEIFER *et al.*, 2003, EGERER *et al.*, 2007). Dans le cytosol de la cellule-cible, l'enzyme, une mono-glucosyltransférase, cible les petites GTPases de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) (VOTH et BALLARD, 2005). Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation dont celles de la régulation de la transcription et de l'apoptose et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine de la cellule (AZNAR et LACAL, 2001, JAFFE et HALL, 2005). Leur monoglucosylation par les toxines A et B empêche leur activation et entraîne une perte de l'intégrité structurale cellulaire, l'arrondissement des cellules et l'apoptose (NOTTROTT *et al.*, 2007).

1.3.3.3 Effets des toxines A et B

Les premières études portant sur les effets des toxines ont permis de mettre en évidence le potentiel entérotoxique de la toxine A. Chez le hamster, et plus modérément chez le rat et la souris, l'administration d'une préparation de toxine A purifiée entraîne la détérioration de la muqueuse digestive ainsi que la perméabilisation de la paroi intestinale (LYERLY *et al.*, 1985). La toxine B, lorsqu'elle est administrée seule, n'a aucun effet sur ces modèles. Les études réalisées *in vitro* démontrent toutefois que la toxine B possède un potentiel cytotoxique plus important que celui de la toxine A sur plusieurs lignées cellulaires en culture (ROTHMAN *et al.*, 1984). Ainsi, les chercheurs ont longtemps suggéré que la toxine A, l'entérotoxine, était impliquée dans l'attaque

initiale des cellules épithéliales intestinales mais que la toxine B, la cytotoxine, jouait un rôle synergique dans la dégradation des parois une fois la muqueuse fragilisée.

Récemment, l'émergence de souches de *C. difficile* d'importance clinique produisant uniquement la toxine B (A⁻B⁺) (voir section 1.3.3.1) a fait surgir de nouveaux questionnements quant au rôle de la toxine B dans la virulence de la bactérie chez l'humain. L'importance des dommages causés par la toxine B sur des cellules humaines du côlon *in vitro* a été démontrée (RIEGLER *et al.*, 1995, DU et ALFA, 2004) et les propriétés entérotoxiques et inflammatoires de la toxine B ont été mises en évidence dans un modèle de souris greffée avec du tissu intestinal humain (SAVIDGE *et al.*, 2003). Jusqu'à maintenant, toutes les études portant sur les effets des toxines avaient été réalisés en administrant des préparations de toxines aux différents modèles. Dans une étude publiée au mois de mars 2009, Lyras *et al.* (LYRAS *et al.*, 2009) ont rapporté la construction de mutants de *C. difficile* chez qui les gènes de la toxine A ou de la toxine B sont inactivés. Leurs travaux ont démontré les effets causés par l'infection de hamsters avec ces mutants. Les mutants du gène de la toxine A provoquent des symptômes similaires à l'infection par des souches de type sauvage alors que les mutants du gène de la toxine B entraînent significativement moins de décès chez les hamsters que les souches produisant les deux toxines. Ces observations renforcent une fois de plus les nouvelles hypothèses voulant que la toxine B soit la principale responsable des manifestations cliniques de l'infection par *C. difficile* chez l'humain.

1.3.4 Toxine binaire

Entre 1% et 16% des souches isolées de *C. difficile* produisent une troisième toxine, la toxine binaire CDT (MCFARLAND *et al.*, 2007). Cette toxine, tout comme les

toxines de *C. perfringens* type E (toxine iota), de *C. spiroforme* (toxine *iota-like*) et de *C. botulinum* types C et D (toxine C2), est composée de deux sous-unités protéiques distinctes qui doivent être présentes pour générer un effet cytopathique (BARTH *et al.*, 2004). La composante a (CDTa) possède une activité ADP-ribosyltransférase spécifique à l'actine (POPOFF *et al.*, 1988, GÜLKE *et al.*, 2001) et la composante b (CDTb) sert à l'attachement aux récepteurs des cellules-cibles et à l'internalisation de la composante a (PERELLE *et al.*, 1997, GONÇALVES *et al.*, 2004). Les gènes *cdtA* et *cdtB* sont situés sur le CDTLoc, à proximité du gène *cdtR*. Ce dernier code pour une protéine d'environ 30kDa de la famille des protéines régulatrices LytR qui régule positivement l'expression des gènes de la toxine binaire. Le CDTLoc est remplacé par une séquence nucléotidique de 68pb chez les souches qui ne produisent pas la toxine binaire (CARTER *et al.*, 2007).

Le rôle exact de la toxine binaire dans la pathogenèse de l'infection à *C. difficile* est encore mal défini. Bien qu'elle soit produite par des souches hypervirulentes (CARTER *et al.*, 2007) et que son potentiel cytotoxique *in vitro* ait été démontré (PERELLE *et al.*, 1997), il est encore trop tôt pour affirmer que la présence de cette troisième toxine est associée à une forme plus sévère de la maladie ou à des manifestations cliniques particulières. Toutefois, des souches produisant uniquement la toxine binaire (A⁻B⁻CDT⁺) ont été identifiées et caractérisées (STUBBS *et al.*, 2000, RUPNIK *et al.*, 2003, GERIC *et al.*, 2006). Le groupe de Geric a démontré les effets de l'intoxication par quatre de ces souches sur deux modèles (lapin et hamster). Les surnageants de culture des souches A⁻B⁻CDT⁺ ont eu un effet entérotoxique sur les cellules de l'iléum de lapins (*rabbit ileal loop assay*) mais la contamination de hamsters avec ces souches n'a entraîné aucun des symptômes caractéristiques de l'infection par *C. difficile* (GERIC *et al.*, 2006). Tout comme Gonçalves *et al.* (GONÇALVES *et al.*,

2004), Geric *et al.* attribuent à la toxine binaire un rôle synergique avec les toxines A et B lors de la dégradation de la paroi du tube digestif.

1.4 Maladie à *C. difficile*

1.4.1 Pathogenèse

Les infections à *C. difficile* se transmettent par la voie fécale-orale. Suite à un contact avec une surface contaminée, les individus ingèrent la bactérie sous sa forme sporulée. Les spores traversent ensuite le tractus digestif pour être transportées jusqu'au côlon (MYLONAKIS *et al.*, 2001, FLETCHER et CINALLI, 2007). Le microenvironnement du côlon (pH, présence de sels et de nutriments) est propice à la germination des spores en leur forme végétative produisant des toxines (PAREDES-SABJA *et al.*, 2008). Pour que *C. difficile* puisse s'implanter de façon efficace au côlon, c'est-à-dire se multiplier et produire suffisamment de toxines pour entraîner la maladie, la flore normale du patient doit avoir préalablement été perturbée (POUTANEN et SIMOR, 2004, OWENS *et al.*, 2008).

1.4.2 Symptômes cliniques

Parmi les principaux signes et symptômes cliniques d'une infection à *C. difficile*, on retrouve les diarrhées, les crampes abdominales, les nausées, la perte d'appétit, la leucocytose et la fièvre modérée (FLETCHER et CINALLI, 2007, HALSEY, 2008). Lorsque la maladie se présente sous l'une de ses formes les plus sévères, elle peut entraîner des colites (inflammations de l'intestin) et même dégénérer en colite pseudomembraneuse, en mégacôlon toxique, en septicémie ou encore mener au décès

(FLETCHER et CINALLI, 2007). Le groupe d'Åkerlund (ÅKERLUND *et al.*, 2006) a identifié chez les patients infectés par *C. difficile* une corrélation entre les taux fécaux de toxines et certains aspects de la présentation clinique de la maladie tels que la fréquence des épisodes de diarrhées ainsi que la présence de douleurs abdominales.

Les effets de *C. difficile* sur le tractus digestif sont généralement confinés à la portion distale du côlon et au rectum. Cette activité toxique localisée principalement au côlon suscite plusieurs hypothèses quant aux raisons pour lesquelles la bactérie s'y implante de façon préférentielle : présence exclusive de sites d'adhésion, production de nutriments et de cofacteurs par la microflore et l'environnement du côlon lui-même, absence de facteurs inhibiteurs retrouvés ailleurs dans le tube digestif, etc.

1.4.3 Confirmation du diagnostic

Une infection à *C. difficile* devrait être soupçonnée chez les patients souffrant de diarrhées et ayant récemment utilisé des antibiotiques. En plus d'observer les symptômes physiques de l'infection à *C. difficile*, les cliniciens confirment un diagnostic positif lorsque la bactérie ou ses toxines sont présentes dans les selles (FLETCHER et CINALLI, 2007). En recherche, on considère que la culture de la bactérie jumelée à la confirmation de la présence des gènes des toxines est le test de référence. Ces manipulations sont toutefois trop longues et fastidieuses pour le laboratoire clinique où l'on utilise plutôt le test de cytotoxicité sur culture cellulaire (PLANCHE *et al.*, 2008). Ce test permet de détecter la présence des toxines dans les selles en visualisant leur effet cytotoxique sur des cellules en culture. Les résultats positifs sont confirmés par la neutralisation des toxines avec une antitoxine de *C. difficile* ou de *C. sordellii*. Malheureusement, ce test est techniquement complexe à réaliser et un délai de 48 h est

nécessaire pour confirmer un résultat négatif (BARTLETT ET GERDING, 2008b). Un second test utilisé couramment pour la détection des toxines au laboratoire clinique est l'EIA (*Enzyme Immunoassay*). Il s'agit d'un test rapide (résultats obtenus en quelques heures) et spécifique (peu de faux-positifs) pour la détection des toxines A et/ou B. Toutefois, environ 10% des cas confirmés par le test de la cytotoxicité ne sont pas détectés par les tests EIA disponibles sur le marché (MERZ *et al.*, 1994). Somme toute, le test le plus fiable à ce jour est la culture de selles (isolement de la bactérie) jumelée à la détection des toxines (BOUZA *et al.*, 2001, DELMÉE *et al.*, 2005). On voit émerger depuis quelques années des techniques de PCR en temps réel pour le dépistage des patients infectés par *C. difficile*. Les premières études indiquent que cette technique est plus sensible que le test de cytotoxicité et qu'elle est comparable à l'isolement de la bactérie (SLOAN *et al.*, 2008, STAMPER *et al.*, 2009).

1.4.4 Colonisation asymptomatique

Certains individus porteurs d'une souche toxigène de *C. difficile* ne développent jamais les symptômes de la maladie. Les nouveau-nés et les bébés âgés de moins d'un an présentent des taux de colonisation asymptomatique particulièrement élevés: ils varient entre 50% et 70% (KATO *et al.*, 1994, BRAZIER, 1998). Dans la population adulte saine, l'incidence de la colonisation asymptomatique par *C. difficile* varie entre 1 et 3%. En milieu hospitalier, cette proportion peut atteindre 20% (GIANNASCA et WARNY, 2004, BARTLETT et PERL, 2005). Selon Bartlett et Perl (BARTLETT et PERL, 2005), cette augmentation de l'incidence reliée à l'hospitalisation est directement associée à une perturbation de la flore normale due à la prise d'antibiotiques.

1.4.5 Facteurs de risque

Les principaux facteurs associés à l'augmentation du risque de colonisation et d'infection par *C. difficile* sont l'âge avancé, l'hospitalisation, la présence de comorbidités ainsi que la prise d'antibiotiques (LABBÉ *et al.*, 2008). Une étude sur la présence dans les selles de *C. difficile*, *C. perfringens* et *S. aureus* chez 89 patients (ACKERMANN *et al.*, 2005) n'a pas permis d'associer l'acquisition de *C. difficile* avec le transfert intra- ou inter-hôpital, les infections, le cancer, les troubles gastro-intestinaux, les maladies neurologiques et les dysfonctions des systèmes endocrinien et squelettique. On y associe toutefois fortement l'âge avancé (supérieur à 60 ans), les maladies vasculaires et cardiaques ainsi que les troubles rénaux et pulmonaires aux infections à *C. difficile*. Les patients qui utilisent des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) augmentent leur risque de contracter une infection à *C. difficile* (DIAL *et al.*, 2004) et la durée de leur hospitalisation est plus longue (NACHNANI *et al.*, 2008). Enfin, selon une étude rétrospective répertoriant les cas traités au CHUS de 1991 à 2003 (PÉPIN *et al.*, 2004), la leucocytose et un taux élevé de créatinine sont associés de façon indépendante à l'augmentation des risques de développer une forme sévère de la maladie.

L'exposition à un antibiotique est à la fois un facteur de risque pour la colonisation par *C. difficile* et pour le développement des symptômes de l'infection (BIGNARDI, 1998). Parmi les antibiotiques qui présentent un risque élevé, on retrouve les céphalosporines de 3^{ième} génération, la clindamycine (THOMAS *et al.*, 2003) ainsi que les pénicillines (OWENS *et al.*, 2008). Plusieurs études épidémiologiques incriminent également l'utilisation des fluoroquinolones (OWENS *et al.*, 2008). En ce sens, Saxton *et al.* (SAXTON *et al.*, 2009) ont démontré que les fluoroquinolones

stimulent la germination des spores et la production de toxines de *C. difficile* dans un modèle du tube digestif humain.

Enfin, la poursuite du traitement antibiotique associé à l'infection à *C. difficile* est un facteur de risque d'échec du traitement spécifique contre la bactérie et même de rechute. L'étude de Modena *et al.* (MODENA *et al.*, 2006) sur 27 patients avec une DACD montre que tous les patients (10/10) dont le traitement initial est arrêté durant le traitement contre *C. difficile* ont une rémission après 14 jours alors que seulement 10/17 patients (59%) qui poursuivent le traitement original ne font pas de rechute après le traitement au métronidazole.

1.5. Traitement des infections

1.5.1 Premiers gestes

Lors du diagnostic d'une DACD, la première action à poser est d'arrêter le traitement antibiotique en cours, si possible, ou de sélectionner un antibiotique avec un spectre d'activité plus restreint. Pour certains individus, le seul changement de la médication va permettre la résolution de l'infection. Pour les formes plus sévères de la maladie, il faudra toutefois traiter le patient avec des antibiotiques. Dans tous les cas, il faut absolument éviter l'administration d'agents anti-diarrhée (anti-péristaltiques) afin d'éviter que les toxines s'accumulent au côlon et entraînent une dégradation plus importante de la paroi intestinale pouvant mener au mégacôlon toxique. Il est également impératif de veiller à ce que le patient demeure hydraté et que ses électrolytes soient contrôlés (SUROWIEC *et al.*, 2006).

1.5.2 Antibiothérapie

Les antibiotiques utilisés pour traiter les DACD sont le métronidazole et la vancomycine. L'administration de ces antibiotiques est généralement effectuée par voie orale, intraveineuse ou rectale. À cause de la différence entre les coûts d'utilisation des deux antibiotiques et leur efficacité équivalente, le métronidazole oral est le traitement de premier choix pour les infections non-complicées (FEKETY, 1997). Les patients aux prises avec une infection sévère, ceux chez qui on ne peut pas utiliser le métronidazole ou qui ne répondent pas à ce traitement sont traités avec de la vancomycine administrée oralement (GERDING *et al.*, 2008). La vancomycine est la seule médication approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement des infections à *C. difficile* (BARTLETT, 2008a). Le risque d'augmentation de la prévalence des entérocoques résistants à la vancomycine (MCGEER et LOW, 2000) pousse cependant les professionnels de la santé et les chercheurs à utiliser et à trouver des traitements alternatifs. Enfin, certaines des formes les plus sévères de l'infection à *C. difficile*, comme le mégacôlon toxique (incidence de 0,4% à 3%), peuvent nécessiter une colectomie (BERMAN *et al.*, 2008).

1.5.3 Rechutes et réinfections

Suite au traitement d'une infection à *C. difficile*, environ 10% à 30% (MAROO et LAMONT, 2006) des patients font une rechute, c'est-à-dire qu'ils voient resurgir leurs symptômes (principalement la diarrhée) de 2 à 10 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie. Le nombre de rechutes chez certains patients peut être impressionnant : de une seule jusqu'à dix ou plus! (MCFARLAND *et al.*, 1999, CONLY, 2000, MAROO et LAMONT, 2006) La persistance des spores dans le tractus digestif suite au traitement et la

réinfection du patient par une souche de l'environnement alors que la flore normale est encore perturbée sont les deux causes associées à la survenue des rechutes. Certains facteurs de l'hôte comme la réponse immunitaire humorale et la capacité à restaurer la flore normale du côlon auraient également un impact sur le taux de rechutes (GAREY *et al.*, 2008).

La méta-analyse de Garey *et al.* (GAREY *et al.*, 2008) a recensé 1215 études portant sur les facteurs de risques associés à la récurrence de l'infection à *C. difficile*, dont 12 (comprenant 1382 patients au total) qui répondaient à leurs critères d'éligibilité. Les facteurs associés de façon statistiquement significative avec un risque de récurrence élevé sont la continuation d'une antibiothérapie non-ciblée pour *C. difficile* suite au diagnostic ($p < 0,0001$), la prise de médicaments anti-acides ($p = 0,019$) et l'âge avancé ($p = 0,0012$). Toutefois, plusieurs variables n'ont pas été considérées dans cette analyse, dont la présence d'une dysfonction immunitaire.

1.5.4 Développement de traitements alternatifs

L'acide fusidique, la teicoplanine et la bacitracine administrées oralement font partie des nouveaux antibiotiques qui sont présentement à l'essai pour le traitement des infections à *C. difficile* (BARTLETT, 2008a). L'OPT-80 de même que le REP3123 sont aussi des molécules antibiotiques dont la spécificité et l'activité *in vitro* et *in vivo* contre *C. difficile* sont en ce moment étudiées (LOUIE *et al.*, 2009, OCHSNER *et al.*, 2009). De plus, McVay et Rolfe (MCVAY et ROLFE, 2000) ainsi que Musher *et al.* (MUSHER *et al.*, 2007) ont obtenu des résultats prometteurs pour le traitement des infections à *C. difficile* avec la nitazoxanide. La nitazoxanide, un anti-protozoaire, est un bloqueur des voies métaboliques des anaérobies utilisé dans le traitement des diarrhées causées par

Cryptosporidium ou *Giardia*. Musher *et al.* (MUSHER *et al.*, 2007) ont comparé l'efficacité de la nitazoxanide chez des patients qui ne répondaient pas au traitement avec le métronidazole (colite persistante ou récurrence). Vingt-six (26) des 35 patients à l'étude (74%) ont vu leur état s'améliorer promptement suite à l'utilisation de la nitazoxanide.

Par ailleurs, plusieurs thérapies n'impliquant pas l'utilisation d'antibiotiques sont également considérées. Ces thérapies sont intéressantes puisqu'elles ne causent pas d'impact sur la flore normale de l'hôte et n'engendrent pas de résistance chez les pathogènes. La résine de cholestyramine et le colestipol sont des résines anioniques pouvant lier les toxines de *C. difficile* (SUROWIEC *et al.*, 2006). Une fois couplées à la résine, les toxines n'ont plus accès à leur récepteur sur les cellules de l'hôte. Similaire aux résines anioniques, le *tolevamer* est un polymère pouvant lier les toxines de façon non-covalente (HINKSON *et al.*, 2008). La molécule de *tolevamer* imite une partie du récepteur cellulaire des toxines. Lorsqu'elles sont liées au *tolevamer*, les toxines ne peuvent plus s'attacher aux cellules hôtes pour y être internalisées. Toutes ces résines se lient aux toxines *in vitro*, mais des études cliniques sont encore nécessaires pour s'assurer de leur efficacité thérapeutique (WEISS, 2009).

Les thérapies d'immunoglobulines (Ivlg), autrefois très populaires, sont encore utilisées aujourd'hui en prophylaxie et pour le traitement des infections microbiennes (BUCHWALD et PIROFSKI, 2003). Les préparations d'anticorps peuvent consister en un plasma ou un sérum animal ou humain, un mélange (*pool*) d'immunoglobulines humaines administré par intraveineuse ou intramusculaire, une préparation à titre élevé d'anticorps provenant de donneurs immunisés ou convalescents ou encore des anticorps monoclonaux (KELLER et STIEHM, 2000). En plus de ne générer aucune

résistance chez les microorganismes, les traitements d'immunothérapie passive ont une forte spécificité pour le pathogène ciblé et peuvent être élaborés beaucoup plus rapidement que des molécules antibiotiques. Ils sont également plus stables que ces dernières et ont une demi-vie plus longue. Plusieurs individus présentant des infections sévères ou persistantes ont vu leurs symptômes résolus rapidement et n'ont pas fait de rechutes suite à l'administration de préparations d'immunoglobulines (SALCEDO *et al.*, 1997, MURPHY *et al.*, 2006, MCPHERSON *et al.*, 2006, HASSOUN et IBRAHIM, 2007). Cependant, comme certains de ces patients recevaient également un traitement antibiotique, le rôle spécifique de l'immunothérapie passive demeure encore à élucider.

L'apparente efficacité des anticorps dans la prévention et le traitement des infections à *C. difficile* a ouvert la voie aux travaux portant sur l'élaboration d'un vaccin contre la bactérie. Les études préliminaires réalisés sur des modèles animaux ont permis de mettre en évidence la présence d'une protection contre la colonisation par la bactérie ou contre la diarrhée et le décès grâce à la vaccination avec certaines protéines de surface de la bactérie (PÉCHINÉ *et al.*, 2007) ou encore avec les toxines (GIANNASCA et WARNY, 2004). Des études cliniques réalisées par la compagnie Acambis sont en cours afin de déterminer si l'administration parentérale d'une préparation des toxines A et B inactivées (toxoides) est sécuritaire et si elle génère une réponse humorale pouvant conférer une protection aux individus (JODLOWSKI *et al.*, 2006). Les premiers sujets humains sains ont bien réagi à l'injection des toxoides et plus de 90% d'entre eux ont produit de fortes concentrations d'anticorps IgG dirigés contre les toxines A et B (KOTLOFF *et al.*, 2001, ABOUDOLA *et al.*, 2003). Sougioultzis *et al.* (SOUGIOULTZIS *et al.*, 2005) ont pour leur part vacciné trois patients souffrant de DACD récurrentes avec la préparation de toxoides. Suite à la vaccination, tous les patients ont cessé de faire des rechutes bien que seulement deux d'entre eux aient eu

une augmentation significative de leurs taux d'anticorps sériques. Des études supplémentaires sont donc requises puisque la protection conférée par la vaccination contre la survenue d'une DACD ou de rechutes n'a pas été démontrée hors de tout doute.

En résumé, de nombreuses avenues thérapeutiques sont présentement à l'étude pour prévenir ou pour guérir les infections à *C. difficile*. Il semble que le traitement idéal contre *C. difficile* doit être efficace contre la croissance et l'établissement du pathogène (production des toxines), doit protéger contre la survenue des rechutes et ne doit pas prédisposer à une nouvelle infection par la bactérie en perturbant la flore normale (MCVAY et ROLFE, 2000). La voie la plus prometteuse semble passer par l'élaboration de thérapies combinant plusieurs agents et permettant d'optimiser les défenses naturelles de l'hôte déjà en place.

1.6 Défenses naturelles de l'hôte

1.6.1 Réponse immunitaire innée

De façon générale, le potentiel du système immunitaire pour défendre l'hôte contre un pathogène est déterminant dans l'issue d'une infection. Depuis la seconde moitié du vingtième siècle, on constate une augmentation drastique du nombre d'individus présentant une réponse immunitaire affaiblie (BUCHWALD et PIROFSKI, 2003). Cette augmentation est attribuable à plusieurs progrès de la médecine, dont l'utilisation de thérapies immunosuppressives (greffes, maladies auto-immunes), ainsi qu'à l'accroissement de l'espérance de vie. En effet, les patients plus âgés ont

davantage de risque de présenter des conditions médicales diminuant leur capacité à élaborer une réponse immunitaire efficace.

Puisque *C. difficile* est un pathogène intestinal non-invasif, la réponse immunitaire orchestrée au niveau des tissus muqueux du tractus gastro-intestinal joue probablement un rôle important dans la défense contre la bactérie (JOHNSON, 1997). L'immunité dite « muqueuse » se distingue de l'immunité systémique par plusieurs caractéristiques qui lui sont particulières. D'abord, les tissus associés aux muqueuses forment le plus important organe lymphoïde du corps, avec environ 400m² de surface de contact avec l'environnement extérieur et 80% des cellules immunitaires de l'organisme. L'ensemble des muqueuses du corps (tractus aéro-digestif et uro-génital, conjonctive, paroi de l'oreille interne et canaux des glandes exocrines) est appelé SIAM (système immunitaire associé aux muqueuses). Les propriétés mécaniques, biochimiques et immunologiques du SIAM lui permettent de générer une défense efficace contre les pathogènes tout en maintenant un état de tolérance (non-réponse) aux particules alimentaires et aux bactéries commensales qui constituent la flore normale (ANJUÈRE et CZERKINSKY, 2007).

L'étape-clé dans le déclenchement d'une réponse immunitaire est la reconnaissance d'une molécule potentiellement menaçante. La spécificité et le raffinement des récepteurs impliqués dans la détection des pathogènes, les *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs), vont permettre de définir la nature des réponses mises en place pour neutraliser un envahisseur ou s'en débarrasser (opsonisation, phagocytose, inflammation, apoptose, etc.) (MEDZHITOV, 2001). Ainsi, les *Toll-like receptors* (TLRs), des membres de la famille des PRRs localisés principalement à la surface des cellules du système immunitaire, sont activés par la liaison spécifique de

plusieurs motifs moléculaires microbiens conservés dont les lipopolysaccharides (LPS) de la paroi bactérienne, l'acide lipotéichoïque ou la flagelline du flagelle (RAMOS *et al.*, 2004, VASWANATHAN *et al.*, 2009). L'association des TLRs avec leurs ligands d'origine microbienne entraîne l'activation de cascades de signalisation menant à la transcription de gènes codant pour des protéines régulatrices des branches innées et acquises de la réponse immunitaire (KENNY et O'NEILL, 2008). Dans un premier temps, la production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines va activer de nombreux acteurs de l'inflammation (macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, neutrophiles, éosinophiles et cellules NK) et entraîner le relâchement de peptides antimicrobiens (JANEWAY et MEDZHITOV, 2002, PÁLFFY *et al.*, 2009). L'expression de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et de molécules de costimulation va ensuite contribuer à l'élaboration d'une défense spécifique contre le pathogène caractérisée par la création d'une mémoire antigénique et la production d'anticorps, dont nous aborderons les détails à la section 1.6.4.

1.6.2 Flore normale intestinale

Les microorganismes commensaux peuplant le tractus digestif sont également impliqués dans la première ligne de défense contre les pathogènes. Plus de 10^{14} microorganismes composent la flore normale intestinale, dont les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterobacterium* et *Lactobacillus* (CERUTTI et RESCIGNO, 2008). Leur présence, affectée entre autres par le génotype de l'hôte, son âge et sa diète (MANSON *et al.*, 2008), est nécessaire au déroulement des processus de digestion ainsi qu'à la protection de l'hôte contre les pathogènes et à la régulation de la réponse immunitaire. En effet, les microorganismes de la flore normale agissent de concert avec les cellules épithéliales entériques et les effecteurs

cellulaires de l'immunité pour maintenir l'homéostasie (MCCRACKEN et LORENZ, 2001). Ils participent à la création d'un environnement impropre à l'implantation des pathogènes en utilisant massivement les nutriments disponibles, en masquant les sites d'adhésions localisés sur la muqueuse et en produisant certaines substances inhibitrices (DONSKEY, 2004).

1.6.3 Propriétés chimiques et mécaniques du tube digestif

Certaines propriétés du tube digestif sont également associées aux défenses non-spécifiques qui contribuent à protéger l'hôte contre les microorganismes pathogènes ingérés. Tout d'abord, le pH physiologique des liquides gastriques tue 99% des bactéries en moins de 5 minutes (HUSEBYE, 2005). L'augmentation du pH intestinal liée à l'utilisation de médicaments (inhibiteurs de pompes à proton) ou à l'âge avancé, par exemple, est corrélée avec la diminution de l'activité bactéricide (HUSEBYE, 2005, GIANNELLA *et al.*, 1972). En second lieu, les mouvements contractiles menant à l'évacuation du contenu intestinal (péristaltisme) préviennent la colonisation du tube digestif par des bactéries pathogènes (HUSEBYE, 2005). Enfin, la couche de mucus recouvrant les parois du tube digestif confère une protection antimicrobienne supplémentaire aux cellules formant la barrière épithéliale (MAGALHAES *et al.*, 2007).

1.6.4 Réponse immunitaire acquise (production d'anticorps)

Lorsque les mécanismes de la réponse immunitaire innée ne suffisent pas pour contrôler adéquatement l'infection, les effecteurs d'une réponse adaptative spécifique sont sollicités. Sous la muqueuse digestive se trouvent des sites organisés pour l'activation des lymphocytes B et la production des anticorps (plaques de Peyer (PPs) et

follicules lymphoïdes) ainsi que des tissus non-organisés (TSUJI *et al.*, 2008). Des cellules spécialisées, les cellules M, sont situées entre les cellules de l'épithélium juste au-dessus des PPs et se chargent de faire passer les antigènes à travers la barrière épithéliale. La présentation des antigènes aux cellules B couplée à la présence de signaux régulateurs transmis par les cellules T auxiliaires entraîne la prolifération des cellules B et la commutation de classe de l'IgM vers l'IgA (LYCKE *et al.*, 1999). Les dimères d'IgA sont ensuite couplés à la chaîne J ('joining') puis se lient au récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR) situé à la base des cellules épithéliales. Le complexe IgA-pIgR est ensuite transporté à travers la cellule épithéliale puis excrété dans la lumière intestinale, où le récepteur est rapidement clivé par les protéases. Les nombreux rôles des IgA sécrétoires (S-IgA) sont bien décrits par Cerutti et Rescigno (CERUTTI et RESCIGNO, 2008). Ces anticorps protègent les surfaces muqueuses en neutralisant les pathogènes et leurs produits spécifiques mais également en empêchant l'activation des voies inflammatoires par les antigènes de la diète ou par les microorganismes commensaux.

Les pathogènes retrouvés à la muqueuse intestinale peuvent aussi induire une réponse humorale systémique. Les anticorps circulants, les immunoglobulines sériques, sont principalement de la classe des IgG (80%) mais on retrouve également des IgA (10 à 15%), des IgM (5 à 10%) et, en moindre concentration, des IgE et des IgD. Les IgM sont produites lors de la réponse primaire et ont une forte avidité pour les antigènes (réponse plus ou moins spécifique). La maturation de la réponse humorale va permettre la comutation de classe vers les autres isotypes et le raffinement de la spécificité des anticorps. Lors d'une réponse secondaire, ce sont des IgG avec une plus grande affinité pour l'antigène qui vont être rapidement produites en grande concentration. Les différentes sous-classes d'IgG (1 à 4) sont impliquées dans l'activation du complément

et/ou dans l'opsonisation (promotion de la phagocytose des antigènes). L'importance relative de la réponse systémique par rapport à la réponse muqueuse lors de la défense contre un pathogène entérique est difficile à déterminer (BRANDTZAEG, 2003). Dans le cas de *C. difficile*, on remarque que les anticorps anti-toxines circulants produits suite à la vaccination parentérale (anticorps sériques) semblent être suffisants pour protéger efficacement les hamsters contre la maladie (GIANNASCA *et al.*, 1999).

1.6.5 Étude des anticorps dirigés contre *C. difficile* chez l'humain

La littérature portant sur la protection conférée par les anticorps naturels contre *C. difficile* est limitée et nous présente des données qui sont contradictoires. Alors que quelques études semblent démontrer l'effet protecteur de la réponse humorale contre la bactérie, d'autres groupes ne parviennent pas à mettre en évidence une relation entre la production d'anticorps et la protection. D'abord, Warny *et al.* (WARNY *et al.*, 1994) ont suggéré l'existence d'une association entre une faible réponse contre la toxine A et la présence de symptômes plus sévères. L'étude de Kyne *et al.* (KYNE *et al.*, 2000) a par ailleurs démontré que les patients qui sont demeurés asymptomatiques suite à la colonisation par *C. difficile* avaient plus d'anticorps IgG dirigés contre la toxine A que les patients qui ont développé les symptômes de la maladie. De plus, selon Maroo et Lamont (MAROO et LAMONT, 2006), l'importance de la présence d'anticorps neutralisants contre *C. difficile* dans la protection contre les rechutes semble bien établie. L'étude de Katchar *et al.* (KATCHAR *et al.*, 2007) a permis de comparer les taux d'anticorps sériques de deux groupes de 13 patients infectés par *C. difficile*. Les taux des sous-classes d'anticorps IgG2 et IgG3 contre la toxine A étaient significativement plus élevés chez le groupe de patients n'ayant pas fait de rechutes, ce qui a porté les auteurs à conclure que les patients avec de faibles concentrations sériques d'IgG2 et

d'IgG3 devraient être surveillés pour la survenue de rechutes. Kyne *et al.* (KYNE *et al.*, 2001) ont également tiré des conclusions similaires avec un groupe de 44 patients ayant acquis en milieu hospitalier une DACD. Les 22 patients qui ont subi une rechute de l'infection suite à l'épisode initial de la maladie avaient significativement moins d'IgM contre la toxine A au jour 3 et moins d'IgG contre la toxine A au jour 12 que les 22 patients du groupe sans rechutes (contrôles).

Cependant, pour certains auteurs, la présence d'anticorps sériques naturels contre *C. difficile* est principalement un reflet de la présence de la maladie mais ne semble pas avoir d'impact sur le déroulement de l'infection (JOHNSON *et al.*, 1992b, STIEGLBAUER *et al.*, 1995). Des conclusions similaires proviennent de l'étude de Sánchez-Hurtado *et al.* (SÁNCHEZ-HURTADO *et al.*, 2008) puisque les taux d'anticorps dirigés contre plusieurs antigènes de *C. difficile* – dont la toxine A – se sont avérés plus élevés chez les cas de DACD que dans un groupe de patients sains.

Le groupe de Péchiné (PÉCHINÉ *et al.*, 2005b) n'a pas observé non plus de différences entre les taux d'anticorps dirigés contre la toxine A et la toxine B des patients avec une DACD que des patients d'un groupe contrôle. Cependant, leurs données ont indiqué que les taux d'anticorps dirigés contre les protéines de surface Cwp66 (extrémité N-terminale), FliC, FliD et Fbp68 étaient statistiquement plus élevés dans le groupe contrôle que chez les patients malades. Dans ce sens, Drudy *et al.* (DRUDY *et al.*, 2004) ont suggéré que des anticorps dirigés contre des antigènes non-toxiques étaient possiblement impliqués dans la protection contre les rechutes. Lors de leur étude, les patients qui ont fait un seul épisode d'infection ont présenté des taux d'anticorps IgM dirigés contre les protéines de surface de *C. difficile* significativement plus élevés que les patients qui ont fait au moins un épisode de rechute.

1.6.6 Test ELISA

L'intensité, la spécificité et la nature d'une réponse humorale peuvent être évaluées selon plusieurs méthodes dont le test de fixation du complément, le test ELISA, l'immunoprécipitation et le test de neutralisation. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de mettre au point un test ELISA afin d'effectuer la détection des anticorps présents dans les échantillons (sérums). Il s'agit d'un test immuno-enzymatique dont le principe a été présenté pour la première fois en 1972 (ENGVALL et PERLMANN, 1972). L'ELISA comporte quatre étapes principales (Figure 2) : i) l'adsorption d'un antigène de capture dans les puits d'une plaque à essais, ii) le blocage des sites libres du puits, iii) l'incubation avec l'échantillon à analyser et iv) la détection avec un anticorps couplé à une enzyme. L'ajout d'un substrat spécifique à l'enzyme permet de générer une réaction colorimétrique dont l'intensité peut être mesurée par spectrophotométrie. Entre chacune des étapes, la plaque doit être lavée à plusieurs reprises dans un tampon contenant un détergent afin de s'assurer de la spécificité de toutes les réactions.

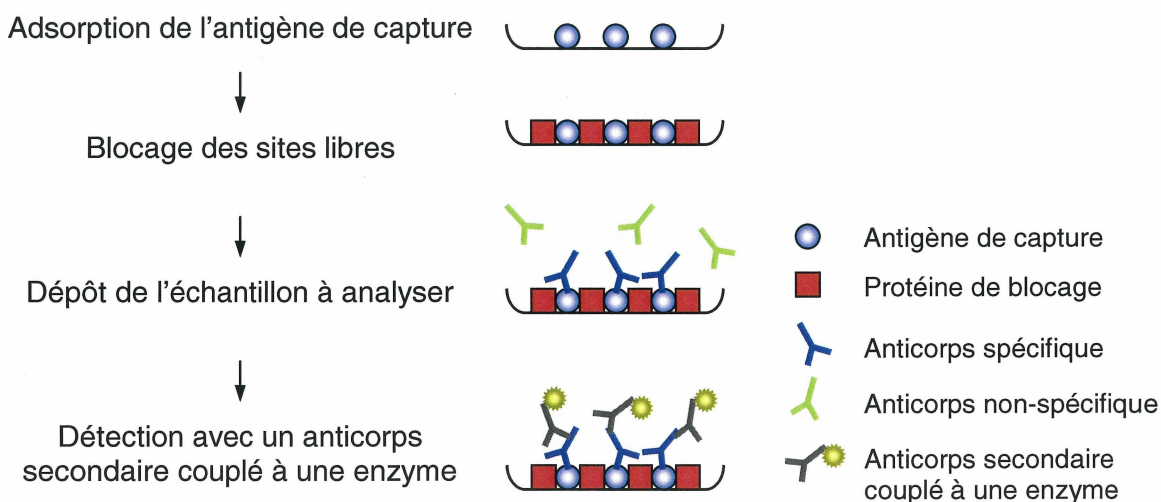


Figure 2. Principe du test ELISA

1.7 Objectifs du projet

Notre étude avait pour objectif principal d'apporter une meilleure compréhension de la réponse immunitaire médiée par les anticorps naturels (réponse humorale) dans la protection de l'hôte contre *C. difficile*. Les hypothèses sous-jacentes à ce projet de maîtrise suggéraient un rôle pour la réponse immunitaire humorale dans l'acquisition, le développement et la résolution d'une infection à *C. difficile*. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les anticorps sériques produits contre différents facteurs de virulence de la bactérie pouvaient servir de marqueurs pour le dépistage des patients à risque d'être colonisés par la bactérie ou de développer des symptômes sévères de l'infection. En évaluant le rôle fonctionnel des anticorps sériques naturels dans la défense contre le pathogène, nous avons aussi voulu vérifier si l'utilisation de protocoles d'immunisation (immunisation passive, vaccination) représentait une stratégie pertinente pour la prévention et le traitement des infections à *C. difficile*.

En premier lieu, l'outil de travail principal – un *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (test ELISA) mesurant les anticorps sériques spécifiques à plusieurs antigènes de *C. difficile* – a été développé, mis au point et validé. Pour ce faire, nous avons d'abord tenté de purifier plusieurs antigènes de la bactérie afin de les utiliser pour la capture des anticorps : les toxines A et B natives, la toxine binaire recombinante et la protéine du flagelle FliD recombinante. Pour des raisons pratiques, nous avons cependant choisi d'utiliser des préparations d'antigènes purifiés qui nous ont été fournies dans le cadre de ce projet (toxines A et B recombinantes (rTcdA et rTcdB), natives (TcdA et TcdB) et inactivées (iTcdA et iTcdB) et préparations de flagellines (Cd et M)). Les paramètres du test ELISA pour chacun des antigènes et le choix de la valeur-seuil de positivité ont été ajustés par rapport au test de neutralisation de la cytotoxicité.

L'évaluation de la séroprévalence des anticorps anti-*C. difficile* a été réalisée dans des groupes de patients qui proviennent de deux études présentant des devis distincts. Ces données nous ont permis de dresser un portrait général du potentiel antigénique de certaines protéines majeures de la bactérie. Enfin, les résultats des analyses sérologiques ont été mis en perspective dans un modèle corrélant la réponse humorale à la colonisation par *C. difficile* et aux manifestations cliniques de l'infection. Les rôles de la flore normale, des caractéristiques anatomiques et physiologiques du tube digestif et des réponses immunitaires innées et acquises de l'hôte ont également été intégrés au modèle.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation des antigènes de capture

2.1.1 Purification des toxines A et B par chromatographie

Nous avons d'abord voulu purifier les toxines A et B complètes à partir du surnageant d'une culture de *C. difficile* en adaptant les protocoles de Kamiya *et al.* (KAMIYA *et al.*, 1989) et de Krivan et Wilkins (KRIVAN et WILKINS, 1987). Après 48 h de culture d'une souche de *C. difficile* locale (NAP1/027) en milieu thioglycollate (BBL Thioglycollate Medium, BD) à 37°C, 60 ml de surnageant ont été récoltés par centrifugation à 1,900 x g (Avanti J-25I Centrifuge, Beckman Coulter) pendant 10 minutes puis filtrés sur une membrane de 0,45 µm (Pall Corporation). Afin d'effectuer une première séparation des toxines A et B et des autres protéines du milieu (contaminants), l'échantillon a été déposé sur une colonne de verre (10x100mm) contenant 5 ml de résine de thyroglobuline porcine¹ (Thyroglobulin Agarose, Sigma). La colonne refroidie à 4°C a été montée sur un système FPLC (FPLC AKTA EXPLORER, GE Amersham). La résine contenant l'échantillon a d'abord été lavée avec 5 volumes de colonne (25 ml) de tampon TBS pH 7,0 froid (la composition détaillée des tampons et des milieux se trouve dans la liste des tampons et des milieux, p. xiii). La toxine B ainsi que les contaminants provenant du milieu de culture n'ont pas d'affinité pour la résine de thyroglobuline et ont été élués en 5 fractions de 5 ml. La toxine A, qui possède une affinité pour le glyco-récepteur de surface Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc de la thyroglobuline bovine à 4°C seulement (KRIVAN et WILKINS, 1987), a été éluee par le passage sur la

¹ Le protocole suggérait l'utilisation de la thyroglobuline bovine mais nous avons utilisé par erreur de la thyroglobuline porcine

colonne de 50 ml du tampon TBS préchauffé à 37°C. La toxine A a été éluée en 10 fractions de 5 ml.

L'éluat contenant la toxine A a ensuite été purifié plus extensivement sur une colonne Hitrap Q Sepharose FastFlow (FF) de 1 ml (GE Healthcare) montée sur un système FPLC et équilibrée dans la solution A (voir p. xiii). La colonne a d'abord été lavée avec 5 volumes de colonne de solution A puis un gradient de NaCl de 0 à 1 M a été formé par l'ajout graduel de la solution saline B (voir p. xiii). Une concentration de NaCl située entre 0,46 et 0,64 M permet de décrocher la toxine A de la résine. Les fractions éluées entre 0,46 et 0,64 M de NaCl ont ensuite été appliquées sur une colonne Mono Q FF (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans la solution A. La colonne a été lavée avec 5 volumes de colonne de solution A puis un gradient de 0 à 1 M NaCl a été formé par l'ajout graduel de la solution B. Un plateau à 0,15 M NaCl (passage d'un volume de colonne) a été utilisé pour se débarrasser des contaminants. La concentration en NaCl permettant d'éluer la toxine A de la colonne Mono Q se situe entre 0,30 M et 0,34 M NaCl.

L'éluat de la colonne de thyroglobuline – contenant la toxine B et les contaminants du milieu de culture – a été passé sur un filtre concentrateur (Ultrafree-15 BioMax-100, Millipore) pour enlever les protéines de taille inférieure à 100 kDa. Le filtrat a ensuite été injecté sur une colonne Hitrap Q Sepharose FF de 1 ml équilibrée dans la solution A. Après le lavage de la résine avec 5 volumes de colonne de solution A, un gradient allant de 0 à 1 M de NaCl (solution B) a été appliqué pour permettre l'élution de la toxine B entre 0,78 et 0,92 M NaCl. L'éluat a été dialysé contre la solution A toute une nuit à 4°C pour se débarrasser des sels. Enfin, les étapes de purification de la toxine B sur la colonne Mono Q sont les mêmes que pour la toxine A. La présence des toxines A

et B dans chacun des éluats a été confirmée selon les méthodes présentées à la section 2.1.3.

2.1.2 Variation des conditions de production des toxines

Quatre souches de *C. difficile*² ont été cultivées dans différentes conditions afin de déterminer quels sont les facteurs de stress et les conditions environnementales qui augmentent la production des toxines A et B *in vitro* ainsi que leur excrétion dans le milieu de culture. Les souches de *C. difficile* servant à préparer des extraits de toxines contrôle ont d'abord été cultivées sur des géloses Brucella (Anaerobic Brucella Agar w/5% Sheep Blood, Oxoid) durant 72 h dans une jarre anaérobie avec des sachets de gaz (GasPak EZ Anaerobe Pouch System, BD) à 37°C. Les colonies isolées ont ensuite été repiquées dans 10 ml de milieu thioglycollate. Après une incubation de 48 h à 37°C, 1 ml de chaque culture a été transféré dans des tubes de 1,5 ml et centrifugé à 15 000 x g (Biofuge A, Baxter CanLab) pendant 1 minute. Avec une pipette de transfert, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes et gardés à 4°C.

Afin de mesurer la production des toxines dans différents milieux de culture liquides, une suspension cellulaire dans un tampon PBS pH 7,4 (voir p. xiii) stérile a été préparée pour chacune des souches. Cinquante microlitres (50 µl) de chaque suspension ont été inoculés dans 10 ml des milieux de culture suivants : thioglycollate (BD), thioglycollate supplémenté avec sérum fœtal bovin (Wisent), TSB (Oxoid), *Cooked Meat Broth* (Oxoid), 2XYT (voir p. xiii). Les tubes ont été incubés à 37°C sans agitation et 1 ml de culture a été prélevé stérilement après 48 h, 72 h et 96 h. Les surnageants ont finalement été récoltés par centrifugation à 15 000 x g pendant 10 minutes à 4°C.

² Souche ATCC 9689, souche France 79685, 2 souches locales (type III et VI)

Chacune des souches a également été testée pour sa capacité à excréter les toxines A et B dans un tampon avec ou sans suppléments (environnement stressant). Les quatre souches ont été cultivées sur gélose BA pendant 72 h, 5 jours ou une semaine puis repiquées dans un tampon PBS régulier ou contenant soit 1 M NaCl ou encore 0,1% ou 2% de glucose ou de fructose. L'incubation dans le PBS a été effectuée à 4°C, à température pièce (TP) ou à 37°C pendant 5 h ou 24 h, sans agitation.

2.1.3 Analyse des préparations de toxines

2.1.3.1 EIA commercial

La présence des toxines A et B dans chacune des préparations purifiées a été évaluée à l'aide d'un test EIA commercial (Premier Toxins A&B, Meridian Bioscience). Brièvement, les extraits de toxines ont été dilués en série dans le tampon d'échantillon fourni puis 100 µl de chacune des dilutions ont été déposés dans les micropuits compris dans la trousse. Les étapes subséquentes ont été effectuées selon les directives du fabricant. La lecture des résultats a été effectuée avec le lecteur de microplaques EL 312e Microplate Bio-Kinetics Reader (Bio-Tek Instruments) à 450-630 nm ($DO_{450-630}$)³.

2.1.3.2 Test de Bradford

Le test de Bradford a été utilisé pour le dosage des protéines totales contenues dans les extraits purifiés. Une courbe standard a d'abord été établie à l'aide de dilutions sérielles d'une solution de BSA (Roche) à 1 mg/ml. L'extrait à doser a été mélangé à 200 µl de réactif de Bradford (Sigma) et le volume de la réaction a été complété à 1 ml avec

³ La valeur du bruit de fond (blanc) est lue sur l'air à 630 nm et soustraite de la valeur de densité optique des échantillons (lecture à 450 nm)

de l'eau distillée. Après 5 minutes, l'absorbance à 595 nm (DO_{595}) a été mesurée au spectrophotomètre (SmartSpec Plus, Bio-Rad) puis reportée sur la courbe standard afin de déterminer la concentration de l'extrait.

2.1.3.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Des électrophorèses sur gel de polyacrylamide (29:1) selon le système de Laemmli (LAEMMLI, 1970) dans l'appareil Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) nous ont permis de visualiser la pureté des extraits. Un gel de résolution à 10% de 1,5 mm d'épaisseur a été utilisé puisque les toxines A et B ont un poids moléculaire élevé (respectivement 270 et 308 kDa). Les échantillons ont été préparés de la façon suivante : 10 μ l d'échantillon ont été ajoutés à 5 μ l de tampon d'échantillon 3X (voir p. xiii) puis chauffés à 95°C pendant 4 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés brièvement (*spin*) avant d'être déposés sur le gel. La migration du gel a été effectuée à 200 V pendant 1 h dans le tampon d'électrophorèse (voir p. xiii). Afin d'estimer la taille des bandes obtenues, des marqueurs de poids moléculaire ont été déposés sur les gels. Les bandes de protéines ont été révélées en incubant le gel durant 30 minutes dans la solution de Bleu de Coomassie (voir p. xiii) puis 60 minutes dans le tampon de décoloration (voir p. xiii).

La coloration au nitrate d'argent, plus sensible (CHEVALLET *et al.*, 2006), a été utilisée lorsque la concentration des protéines d'intérêt était trop faible pour être visualisée par une coloration au bleu de Coomassie. Après l'électrophorèse, le gel a été agité dans une solution à 50% (v/v) de méthanol pendant 1 h à TP puis rincé à l'eau distillée. Il a été incubé avec la solution d'argent (voir p. xiii) pendant 15 minutes avec agitation. Un second rinçage à l'eau distillée pendant 5 minutes a permis d'enlever

l'excès de solution d'argent du gel avant son incubation dans la solution de révélation (voir p. xiii). Après un dernier rinçage, le processus de coloration a été arrêté en trempant le gel dans une solution d'acide acétique 7% pendant 30 minutes.

2.1.3.4 Immunobuvardage western

La présence spécifique des toxines A et B a été confirmée par immunobuvardage western. Nous avons d'abord fait migrer les extraits sur un gel de polyacrylamide selon le protocole décrit ci-haut. Après la migration, le gel a été incubé dans le tampon de transfert (voir p. xiv) pendant 15 minutes. Pendant ce temps, la membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) a été réhydratée successivement dans de l'eau distillée puis dans le tampon de transfert. Tous les transferts western ont été effectués dans l'appareil Mini TransBlot (Bio-Rad), selon le protocole fourni par le fabricant. Le transfert est effectué à 30 V pendant 16 h à 4°C.

Une fois le transfert terminé, la membrane de nitrocellulose a été retirée du support et rincée à l'eau distillée. Une première incubation pendant 1 h à TP dans le tampon de blocage (voir p. xiii) a tout d'abord permis de bloquer les sites non-fixés par des protéines sur la membrane. La membrane a ensuite été placée pendant 1 h à 37°C dans un sachet scellé contenant 3 ml d'une dilution de l'anticorps primaire (MAb to *C. difficile* Toxin A ou Toxin B (1:500), Biodesign, sérum neutralisant anti-toxines A et B (1:100), Bartels) ou de l'échantillon de sérum à tester (1:100) dans le tampon de dilution (voir p. xiii). Afin de diminuer le bruit de fond dû aux réactions non-spécifiques, la membrane doit être lavée à 3 reprises dans un grand volume de tampon de lavage (voir p. xiv) pendant 10 minutes en agitant fortement. La membrane a ensuite été incubée pendant 1 h à 37°C dans un sachet contenant 3 ml de l'anticorps secondaire couplé à

une peroxydase dilué dans le tampon de dilution (Peroxydase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (1:5000), Peroxydase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L) (1:20 000), Jackson ImmunoResearch Laboratories) avant d'être lavée comme ci-haut. Le dernier lavage doit être effectué dans un tampon TBS. Finalement, la membrane a été recouverte pendant 5 minutes avec une solution de substrat de la peroxydase (TMB/H Substrate, Chemicon). La réaction a été arrêtée en rinçant la membrane à l'eau distillée.

2.1.4 Clonage du gène *cdtB* de la toxine binaire

2.1.4.1 Préparation des inserts

Nous avons voulu cloner en 3 fragments (voir Figure 3) la portion du gène *cdtB* située à l'extrémité 3' du peptide signal. Tous les fragments se terminent au codon *stop* du gène d'origine. Le premier fragment, que nous avons appelé *binI*, comporte la totalité du gène *cdtB*. Le second fragment, *binII*, débute après la séquence de clivage protéolytique. Enfin, le fragment *binIII* débute tout juste après le domaine de translocation membranaire.

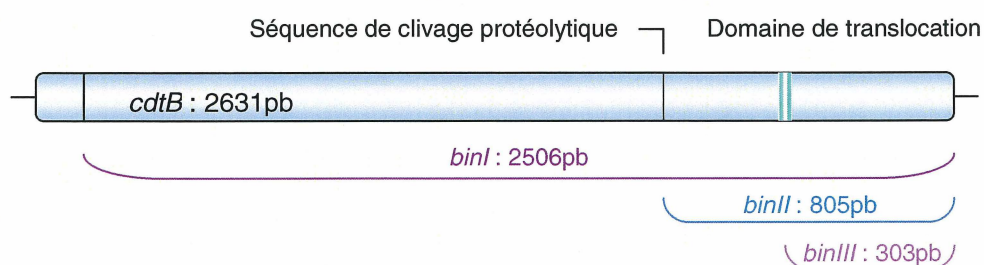


Figure 3. Schéma des fragments clonés du gène *cdtB*

L'ADN génomique d'une souche locale toxigène de *C. difficile* a d'abord été extrait avec la trousse High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), selon le protocole du fabricant. Une souche de *C. difficile* locale congelée à -80°C a été cultivée pendant 72 h à 37°C dans 10 ml de milieu thioglycollate. Le culot de 1 ml de culture a été récolté par centrifugation à 15 000 x g pendant 5 minutes puis resuspendu dans 200 µl de PBS. Un volume final de 200 µl de matériel génomique purifié a été élué.

Les amorces utilisées pour l'amplification PCR du gène *cdtB* se trouvent dans le Tableau 1. Le site de coupure de l'enzyme NcoI (vert) a été intégré aux amorces *forward* et l'amorce *reverse* contient le site de coupure de l'enzyme SacI (rouge).

Tableau 1. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification PCR du gène *cdtB*

Amorce	Séquence (5'-3')
CdBin1F	GGTTGCTCCATGGGAGAAATTGTAAATGAAGATATACTCC
CdBin2F	GGTTGCTCCATGGGATTGATGTCTGATTGGGAAGACGAAG
CdBin3F	GGTTGCTCCATGGGAACAAATGAACATGCCTCTACTGATC
CdBin1R	CCATGCTGAGCTCTAATCAACACTAAGAACTAATAACTGTC

La séquence complète du gène de la toxine binaire (CHANG et SONG, 2001; numéro d'accèsion GenBank : AF271719) ainsi que le positionnement des amorces utilisées se trouvent dans l'Annexe A. La réaction de PCR ayant servi à amplifier les 3 fragments à cloner comprenait 50 cycles de 3 étapes : la dénaturation à 93°C pendant 30 secondes, l'hybridation à 60°C pendant 1 minute et l'élongation à 72°C pendant 3 minutes. La concentration de MgCl₂ ayant été utilisée est de 2 mM. Toutes les réactions de PCR ont été réalisées dans l'appareil GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer)

avec au total 2 U/50µl d'un mélange 15:1 des polymérases à ADN Taq et Pfu (préparations maisons).

L'ADN amplifié a ensuite été digéré successivement par l'enzyme de restriction SmaI puis par NcoI (New England BioLabs) afin de générer des extrémités cohésives. La digestion a été effectuée selon les directives du fabricant avec 20 unités (U) par réaction de chaque enzyme durant 3 h dans un bain à 37°C. Les inserts digérés ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 1% (Promega) aux côtés du marqueur de poids moléculaire 1kb DNA Ladder (Invitrogen) afin d'évaluer leur concentration et leur pureté.

2.1.4.2 Préparation des vecteurs

Les plasmides qui ont été choisis pour le clonage des fragments de *cdtB* sont les vecteurs pET-20b(+) et pET-39b(+) (Invitrogen). Les cartes des plasmides se trouvent dans l'Annexe B. Le plasmide pET-20b(+) est porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline et pET-39b(+) possède un gène de résistance à la kanamycine. Les deux vecteurs permettent de coupler le gène cloné à une étiquette histidine pour faciliter la purification de la protéine recombinante. Trois microgrammes (3 µg) de chacun des deux vecteurs ont d'abord été digérés avec SmaI durant 2 h dans un bain à 37°C dans une réaction comprenant 20 U d'enzyme, le tampon NEB 1 (concentration finale 1X) et 100 µg/ml de BSA. Ils ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 1% de 3 mm d'épaisseur comprenant 8 puits de 1,5 mm de largeur. Le gel a été coloré pendant 15 minutes par trempage dans une solution de 1 µg/ml de bromure d'éthidium (Sigma) puis la bande correspondant à chaque vecteur linéarisé a été visualisée sous une lumière UV (Chemilmager Ready) et excisée à l'aide d'un bistouri. Les vecteurs digérés linéarisés ont été extraits du gel avec la trousse QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), selon les

instructions du fabricant. Les vecteurs ont ensuite été digérés avec NcoI durant 2 h dans un bain à 37°C avec 20 U de l'enzyme dans le tampon 3 de NEB puis ils ont été purifiés à l'aide de la trousse QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), selon les instructions du fabricant. Finalement, l'extrémité-5' des vecteurs a été déphosphorylée avec 3 U d'Antarctic Phosphatase (NEB) afin d'éviter leur recircularisation.

2.1.4.3 Ligation

Les réactions de ligation ont été effectuées selon le protocole de Novagen avec la ligase à ADN T4 (préparation maison) dans le tampon de ligation (voir p. xiv). La présence de produits de ligation conformes à ceux attendus a été confirmée à l'aide de plusieurs réactions de PCR utilisant des amorces situées sur le vecteur et/ou sur l'insert. Les conditions de la réaction PCR, les amorces utilisées ainsi que les séquences complètes de chacune des constructions se trouvent dans l'Annexe C.

2.1.4.4 Transformation des cellules compétentes

Les cellules compétentes XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene) ont été utilisées selon les instructions du fabricant pour répliquer les vecteurs ayant intégré un insert. Le plasmide pUC18 fourni avec les cellules compétentes a servi de contrôle de transformation. Ce sont 2 µl de chaque réaction de ligation qui ont été transformés dans 100 µl de cellules compétentes. Suite à la transformation, les cellules ont été étalées sur des géloses LB contenant 100 µg/ml ampicilline (pET-20b(+)) et pUC18) ou 30 µg/ml kanamycine (pET-39b(+)). Le plasmide porté par les clones suite à la transformation a été purifié avec la trousse QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Les constructions provenant de 20 colonies isolées par clone ont été vérifiées en déposant sur gel d'agarose 1% le plasmide linéarisé (digestion avec SacI ou NcoI selon le protocole

présenté ci-haut) ainsi que les produits d'amplification par PCR du plasmide (mêmes conditions et amorces que pour la confirmation des ligations). Les plasmides (un représentant de chaque clone) ainsi que les inserts ayant servi aux ligations ont ensuite été envoyés au séquençage (Plateforme de séquençage de l'Université Laval) afin de s'assurer de l'intégrité des séquences.

Suite au séquençage, nous avons comparé les séquences obtenues avec les séquences attendues à l'aide de l'application BLAST (bl2seq, NCBI). Nous avons constaté que les inserts ainsi que les plasmides contenaient plusieurs variations polymorphiques par rapport à la séquence publiée (voir section 3.1.3). Nous avons toutefois poursuivi le protocole en utilisant ces plasmides puisque le cadre de lecture semblait intact. Les cellules compétentes HMS174(DE3)pLysS (Novagen) ont été utilisées pour l'expression des protéines. Ces cellules portent le gène de l'ARN polymérase T7 sous contrôle de l'opéron *lac*. L'ajout d'IPTG permet de déloger le répresseur de l'opérateur pour qu'il y ait production d'un ARN messager et expression de la polymérase. L'ARN polymérase T7 peut ensuite se lier au promoteur T7 situé sur le vecteur en amont du gène cloné. La transformation des constructions dans la souche d'expression a été effectuée selon les instructions du fabricant, en utilisant 5 ng d'ADN pour transformer 20 µl de cellules compétentes. Les réactions ont été étalées sur des géloses LB contenant 34 µg/ml de chloramphénicol ainsi que les antibiotiques nécessaires pour sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide (pET-20b(+)) : 50 µg/ml carbénicilline⁴, pET-39b(+)) : 30 µg/ml kanamycine).

⁴ Les fournisseurs des cellules compétentes (Novagen) suggèrent d'utiliser de la carbénicilline plutôt que de l'ampicilline puisqu'il s'agit d'un antibiotique moins sensible à la diminution du pH causée par la croissance bactérienne dans un milieu de culture.

2.1.4.5 Expression et purification des protéines recombinantes

En s'inspirant du protocole fourni par la compagnie Novagen, nous avons d'abord effectué des tests d'induction avec les différents clones obtenus puis vérifié la localisation de la protéine d'intérêt suite à son expression. Une colonie isolée sur gélose de chaque clone a été repiquée dans 3 ml de milieu LB (voir p. xiii) avec antibiotiques. Le contrôle d'induction L fourni dans la trousse du vecteur pET-39b(+), un contrôle servant à vérifier la production des protéines par la souche d'expression suite à l'induction, a été traité de la même façon que les clones. Les cultures ont été incubées sous agitation toute la nuit à 37°C puis ont été réensemencées dans 3 nouveaux tubes (A, B, C) de milieu LB avec antibiotiques (5 µl de culture dans 5 ml de milieu). Les tubes ont été remis dans l'incubateur jusqu'à ce que la DO_{600} ait atteint une valeur située entre 0,5 et 1. Les tubes A ont servi à prendre les mesures de densité optique. De l'IPTG (Promega) a ensuite été ajouté (concentration finale de 0,4 mM) dans les tubes B. Les tubes C ont été laissés tels quels. Les cultures induites (B) et les contrôles sans induction (C) ont été placés à TP avec agitation toute la nuit puis le surnageant a été récolté par centrifugation à 9,600 x g pendant 10 minutes. Enfin, le surnageant a été placé à 4°C pour des analyses subséquentes et une extraction des protéines périsplasmiques et des protéines insolubles (Novagen) a été effectuée sur le culot.

D'abord, le culot a été resuspendu dans 3,75 ml de tampon d'extraction (voir p. xiii) et agité doucement à TP pendant 10 minutes. Après l'incubation, la suspension a été centrifugée à 9,600 x g pendant 10 minutes. Le surnageant a été mis de côté et le culot a été repris dans 3,75 ml d'une solution de 5 mM $MgSO_4$ avant d'être mélangé sur glace pendant 10 minutes puis centrifugé à nouveau. Le surnageant, contenant la fraction périsplasmique, a été transféré dans un nouveau tube. Afin d'en extraire les protéines

insolubles, le culot a été resuspendu dans 4 ml de tampon urée (voir p. xiv) et incubé à TP avec agitation pendant 15 minutes. Finalement, le surnageant contenant les protéines insolubles a été récupéré après une centrifugation à 17,000 x g pendant 20 minutes. La présence de la protéine dans chacune des fractions (matériel excrété, périsplasmique, insoluble) a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage western, selon les protocoles présentés précédemment. L'anticorps primaire utilisé pour la détection des protéines marquées est un anticorps anti-étiquette His dilué 1:1000 (Anti-His Tag Mouse Monoclonal Antibody, BioShop) et l'anticorps secondaire est un anticorps anti-IgG de souris couplé à une peroxydase dilué 1:3000 (Peroxydase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Les tailles attendues des protéines BinI, BinII et BinIII sont respectivement de 95, 75 et 64 kDa, selon une estimation à l'aide du logiciel *Protein molecular weight* (http://bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

Les extraits ont ensuite été enrichis et purifiés sur une résine de nickel selon le protocole de QIAGEN. La résine de nickel possède une affinité pour les étiquettes histidines en présence de faibles concentrations d'imidazole (10-20 mM). Les extraits induits (IPTG) et non-induits (contrôles) ont d'abord été concentrés par un facteur de 8 sur une membrane filtrante retenant les protéines de plus de 10 kDa (Amicon Ultra-15 Ultracell-10k, Millipore). Ils ont ensuite été dialysés toute une nuit contre le tampon de liaison (voir p. xiv) dans un tube à dialyse (D-tube dialyzer, EMB). Les extraits ont été déposés sur une colonne contenant 1 ml de résine Ni-NTA-Agarose 50% (QIAGEN) puis la colonne a été scellée et mélangée par inversion à 4°C pendant 60 minutes. La colonne a ensuite été débouchée pour permettre l'écoulement du *flow-through* et 8 ml de tampon de colonne (voir p. xiii) ont été passés sur la résine afin d'en éliminer tous les contaminants. Les protéines avec une étiquette His ont été éluées en 12 fractions de 0,5

ml par le passage sur la colonne de 6 ml de tampon d'élution (voir p. xiii). La concentration protéique de chaque fraction a été déterminée par un test de Bradford et la présence des protéines marquées a été confirmée par immunobuvardage western.

2.1.5 Expression et purification de la protéine FliD

Un clone de *E. coli* portant le gène de la protéine FliD de *C. difficile* a gracieusement été offert à notre laboratoire par le Dr. Anne Collignon, de l'Université de Paris-Sud (France). La souche d'expression BL21(DE3) a été transformée avec le plasmide pGEX-6P-1 (GE Healthcare) porteur du gène *fliD* (numéro d'accension GenBank : AF297024) (TASTEYRE *et al.*, 2001a). Ce plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline. Les bactéries ont d'abord été étalées sur un milieu sélectif 2XYT contenant 100 µg/ml d'ampicilline (2XYT-amp). Une colonie isolée a été sélectionnée et repiquée dans 30 ml de milieu 2XYT-amp puis incubée à 37°C toute la nuit. Le lendemain, 10 ml de la culture ont été transférés stérilement dans 1 L de milieu 2XYT-amp frais supplémenté avec 2% glucose. Le glucose sert à réprimer l'expression basale de la protéine clonée avant l'induction avec l'IPTG. Cette nouvelle culture a été incubée à 37°C en agitant fortement jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0,7. De l'IPTG en poudre a alors été ajouté au milieu pour obtenir une concentration finale de 0,1 mM. Enfin, la culture induite a été fortement agitée toute la nuit à TP puis les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 7,600 x g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines excrétées par la bactérie a été conservé à 4°C.

Par la suite, le culot bactérien a été resuspendu dans 10 ml de PBS froid. Les cellules ont été brisées en soniquant sur glace à puissance 50 (Sonic dismembrator, ARTEK) des volumes de 5 ml durant 2 périodes de 2,5 minutes séparées par une pause

de 10 secondes. Finalement, le surnageant a été récolté par centrifugation à 11,800 x g pendant 10 minutes puis filtré sur une membrane de 0,22 µm. Cet extrait a été mélangé à 3 ml de résine Glutathione Sepharose 4B 50% (GE HealthCare) toute une nuit sur glace. La résine a ensuite été transférée dans une colonne de chromatographie, lavée avec 10 volumes de colonne de PBS froid pour éluer les contaminants puis équilibrée dans 5 volumes de colonne de tampon de clivage (voir p. xiii). L'enzyme PreScission Protease (GE HealthCare) a été déposée sur la résine (100 U) avec 5 ml de tampon de clivage puis la colonne a été scellée et mélangée par inversion durant une nuit à 4°C. La protéine détachée de l'étiquette GST a pu être élue de la résine en 40 fractions de 0,5 ml. Du tampon PBS froid a été ajouté sur la colonne jusqu'à ce que les fractions éluées ne contiennent plus de protéines. Enfin, l'étiquette GST a été détachée de la résine par le passage de 5 volumes de colonne de tampon glutathione réduite (voir p. xiv). La présence de protéines recombinantes couplées à une étiquette GST a été confirmée à chacune des étapes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par immunobuvardage western selon les protocoles décrits ci-haut. L'anticorps utilisé pour la détection des protéines marquées est un anticorps anti-étiquette GST couplé à une peroxydase dilué 1:1000 (Glutathione-S-Transférase (GST) Affinity Purified Antibody, HRP conjugated, Cedarlane).

2.2 Échantillonnage des sérums

2.2.1 Étude A (sous la direction du Dre Vivian Loo)

L'étude épidémiologique prospective de cohorte dirigée par le Dre Loo comporte plusieurs volets de recherche associés à la compréhension de l'épidémiologie clinique et moléculaire des infections par *C. difficile*. Le recrutement des patients de cette étude a

été effectué dans 6 hôpitaux du Québec et de l'Ontario. Chaque patient adulte consentant répondant aux critères d'inclusion qui s'est présenté dans l'une ou l'autre des unités de soins sélectionnées (1 à 3 pour chacun des hôpitaux) a été enrôlé. Au moment de l'entrée dans l'étude (jour 1), une culture de selles pour la recherche de *C. difficile* a été réalisée et un échantillon de sérum a été prélevé pour chacun des patients. Lorsque survenait un épisode de diarrhée à *C. difficile*, un second prélèvement de sérum ainsi qu'une nouvelle culture de selles étaient effectués. Ces prélèvements ont été répétés de façon hebdomadaire durant l'épisode de maladie ainsi que lors de la survenue de rechute(s). Tous les patients, porteurs ou non de la bactérie, ont également eu un prélèvement de sérum au congé de l'hôpital. Un questionnaire recensant les informations personnelles du patient (âge, sexe, prise d'antibiotiques, etc) ainsi que ses antécédents médicaux a été complété tout au long de l'étude. Les souches isolées lors de l'étude ont été typées par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le titre des toxines produites par ces isolats a été déterminé.

2.2.2 Étude B (sous la direction du Dr Louis Valiquette)

L'étude du Dr Louis Valiquette, orientée vers l'identification des facteurs pouvant prédire la sévérité de la maladie à *C. difficile*, a été réalisée dans plusieurs hôpitaux du Québec et de l'Ontario. Les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude proviennent de deux des sites de l'étude. Les patients adultes consentants présentant un résultat positif lors de la recherche des toxines de la bactérie dans les selles et répondant aux critères d'inclusion de l'étude ont été enrôlés dans le projet. Le prélèvement d'un échantillon de sérum a été réalisé lors de l'admission dans l'étude (jour 1) et environ 21 jours plus tard chez les individus étant toujours hospitalisés. Un

questionnaire recensant les informations sur les patients, dont l'historique des infections à *C. difficile*, a également été rempli et un suivi téléphonique a été effectué au jour 90.

2.2.3 Entreposage et codage des sérums

Tous les sérums ont été conservés à -20°C. Chaque sérum a été identifié par les initiales de l'hôpital d'origine ainsi que par le numéro d'étude attribué au patient. Des lettres à la fin des numéros ont servi à indiquer l'ordre de prélèvement des sérums lorsque plusieurs échantillons provenaient d'un même patient. Durant toute la durée des analyses, nous n'avons pas eu accès aux informations personnelles des patients de même qu'aux résultats des tests effectués dans d'autres centres puisqu'il s'agissait d'une étude réalisée en double aveugle.

2.3 Mise au point et application du test ELISA

2.3.1 Préparation d'un groupe contrôle (neutralisation de la cytotoxicité)

La première étape de la mise au point du test ELISA a été la préparation d'un groupe contrôle à l'aide du test de neutralisation de la cytotoxicité. Les cellules utilisées pour ce test proviennent de la lignée MRC-5 (Diagnostic HYBRIDS). Les cellules MRC-5, des fibroblastes diploïdes humains issus de poumons fœtaux, sont faciles à cultiver et les effets de l'intoxication par les toxines de *C. difficile* sur ces cellules sont aisément reconnaissables. Puisque nous ne disposions pas d'un échantillon de toxines A et B purifiées lors de ces travaux, le surnageant d'une culture de 72 h d'une souche de *C. difficile* hypervirulente NAP1/027 locale a servi en tant qu'extrait toxique. Ce surnageant a été récolté après centrifugation et concentré, puis dilué en série jusqu'à

256 fois dans du PBS stérile. Le surnageant de culture d'une souche locale non-toxinogène, préparé selon le même protocole, a été utilisé comme contrôle négatif.

Il a d'abord fallu titrer l'extrait toxique afin de déterminer la concentration entraînant la mort de 50% des cellules constituant le tapis cellulaire après 24 h. Les cellules MRC-5 diluées dans du milieu DMEM (Wisent) supplémenté (10% sérum fœtal bovin (Wisent), 1% pénicilline (GIBCO) et 1% amphotéricine B (Wisent)) ont d'abord été amenées à confluence dans des plaques de culture de 96 puits (Wisent). Le milieu de culture a ensuite été retiré et 25 µl de chaque dilution de surnageant de culture ont été ajoutés aux cellules. Après 15 minutes d'incubation, les cellules ont été recouvertes avec 200 µl de milieu DMEM supplémenté contenant 1% gentamicine (Wisent) puis placées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂. Les observations au microscope ont été réalisées après 24 h et 48 h d'incubation.

Un groupe de 108 sérums a été prélevé aléatoirement dans la banque de sérums provenant de l'étude A. Pour tester le potentiel neutralisant des sérums, nous avons utilisé une concentration d'extrait toxique équivalente à 4 fois la concentration requise pour entraîner 50% de mort cellulaire après 24 h (4 unités ou 4 U). Chaque sérum a été dilué 1:10 dans l'extrait de toxines puis ce mélange a été incubé à TP pendant 1 h pour permettre aux anticorps sériques de neutraliser les toxines. Après avoir retiré le milieu de culture des cellules préparées comme ci-haut, 25 µl de mélange sérum-toxines a été ajouté aux cellules. La suite du protocole est conforme à celui utilisé pour titrer les surnageants. Tous les sérums (n=20) qui ont protégé partiellement ou complètement les cellules de l'effet cytotoxique de même qu'un échantillon de sérums négatifs (n=12) ont ensuite été titrés. Pour ce faire, ils ont été dilués 1:10, 1:30, 1:100 et 1:300 et mis en présence de 2, 3 ou 4 unités de toxines puis le protocole présenté ci-haut a été appliqué.

Ces sérums ont été classés lors de l'observation après 24 h d'incubation selon les critères suivants : un sérum négatif n'a pas neutralisé plus de 5% de l'effet cytotoxique causé par 2 U de toxines, un sérum intermédiaire a neutralisé au moins 50% de l'effet cytotoxique causé par 2 U de toxines et un sérum positif a totalement neutralisé l'effet cytotoxique causé par 4 U de toxines.

2.3.2 Antigènes utilisés dans l'ELISA

Comme nous le verrons plus en détails dans la section 3.1, les démarches réalisées afin de purifier les toxines A et B natives et d'exprimer une protéine de flagelle recombinante se sont avérées infructueuses. Dans les deux cas, les préparations de protéines n'étaient ni assez pures ni suffisamment concentrées pour être utilisées pour tester des milliers d'échantillons. De même, plusieurs étapes de mise au point demeurent nécessaires afin d'exprimer et de purifier les produits du gène cloné *cdtB*.

Nous avons donc utilisé des protéines recombinantes correspondant à la portion C-terminale des toxines A et B de *C. difficile* (rTcdA et rTcdB; numéros d'accension GenBank des séquences des gènes clonés : AY238985 et AY238986, LETOURNEUR *et al.*, 2003) qui nous ont été fournies par la compagnie BioMérieux (Marcy L'Étoile, France). Nous avons également obtenu les toxines A et B natives purifiées (TcdA et TcdB) ainsi que les toxines A et B natives purifiées inactivées (toxoides : iTcdA et iTcdB) des laboratoires Acambis Inc. (Cambridge, MA) (KOTLOFF *et al.*, 2001). Enfin, deux extraits de flagelles (Cd630 (Cd) et M9349 (M)) préparés à partir de cultures de *C. difficile* nous ont été offerts par le Dre Susan Logan (Institute for Biological Sciences, National Research Council, Ottawa).

2.3.3 Ajustement des paramètres de l'ELISA

À partir des résultats du test de neutralisation de la cytotoxicité, nous avons sélectionné un sous-groupe de 32 sérums comprenant 14 sérums négatifs, 11 sérums intermédiaires et 7 sérums positifs. Chacune des étapes de l'ELISA a été testée dans plusieurs conditions (Tableau 2) et a été optimisée de façon à ce que les résultats obtenus concordent le mieux possible avec le test de neutralisation. C'est la toxine B recombinante (rTcdB) qui a servi d'antigène de capture pour l'ajustement des paramètres. Une fois le test mis au point, la concentration optimale de chacun des autres antigènes de capture a été déterminée.

Tableau 2. Conditions d'ajustement des paramètres du test ELISA

Paramètres	Conditions		
Concentration de l'antigène de capture	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
Choix du bloqueur	3% BSA		5% lait
Temps d'incubation avec le bloqueur	1 h	3 h	24 h
Température d'incubation avec le bloqueur	37°C		TP
Dilution des sérums	1:100	1:300	1:900
Temps/température d'incubation avec les sérums	1 h à 37°C		1,5 h à TP

2.3.4 Protocole de l'ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés dans des plaques de 96 puits transparentes (Costar) en utilisant les conditions déterminées selon la procédure décrite ci-haut. D'abord, les antigènes de capture ont été dilués dans un tampon carbonate pH 9,6 (29 mM Na₂CO₃, 71 mM NaHCO₃) et déposés sur les plaques (100 µl/puits). Les concentrations des antigènes de capture utilisés dans l'ELISA sont présentées dans le Tableau 3. Les plaques ont été incubées durant 1 h à 37°C sur une plaque rotative (Lab Rotator, Lab-line) puis gardées à 4°C pour un minimum de 48 h et un maximum de 96 h avant d'être utilisées. Les puits ont ensuite été lavés à 5 reprises dans 300 µl de tampon PBS contenant 0,05% Tween 20 (Bio-Rad) (PBS-T). Le blocage a été effectué en incubant les plaques durant 3 h à 37°C avec un tampon PBS-T contenant 3% (p/v) BSA (100 µl/puits). Par la suite, les puits ont été lavés comme précédemment avant d'ajouter 100 µl de sérum dilué

Tableau 3. Concentration des antigènes de capture utilisés dans le test ELISA

Antigène	Concentration (µg/ml)
rTcdA	1
rTcdB	1
TcdA	1
TcdB	0,5
iTcdA	0,5
iTcdB	0,35
Flagelles Cd	0,125
Flagelles M	0,125

1:100 dans le tampon d'échantillon (PBS-T contenant 1% (p/v) BSA). Les plaques ont été incubées à TP durant 1,5 h sur une plaque vibrante (PMX-01E, Fujirebio Inc.) puis lavées de nouveau. L'anticorps secondaire, un anti-anticorps IgA, IgG et IgM humains couplé à une peroxydase (ImmunoResearch Laboratories) a été dilué 1:20 000 dans le tampon d'échantillon, ajouté sur la plaque (100 µl/puits) et incubé pendant 0,5 h à TP sur

une plaque vibrante. Après un dernier lavage, le substrat TMB (TMB Single Solution, Invitrogen) a été ajouté et le développement de la réaction a été fait durant 15 minutes à TP à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée avec 100 µl/puits de 1 M HCl puis la densité optique a été lue à 450-630 nm ($DO_{450-630}$).

2.3.5 Valeur-seuil de positivité

La méthode de calcul de la valeur-seuil de positivité choisie pour le test ELISA a été tirée de l'article de Frey *et al.* (FREY *et al.*, 1998). Cette méthode permet de déterminer, selon le niveau de confiance désiré, la valeur maximale que peut prendre un échantillon négatif dans un test immuno-enzymatique. Elle nécessite l'utilisation de 2 contrôles négatifs ou plus. Pour les besoins du projet, nous avons testé 4 contrôles négatifs différents (voir section 2.3.7.2) sur chacune des plaques et fixé le niveau de confiance à 95%. La formule mathématique permettant de calculer la valeur-seuil est la suivante :

$$DO \text{ moyenne des contrôles} + f \text{ écart-type} = \text{valeur seuil}$$

La valeur de f varie selon le nombre de contrôles utilisés. Lorsque 4 contrôles négatifs sont utilisés, elle est de 2,631.

2.3.6 Sensibilité, spécificité et reproductibilité de l'ELISA

Afin de déterminer la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité de l'ELISA, 7 sérums fortement positifs et 14 sérums négatifs provenant du groupe-contrôle ainsi que 11 sérums inconnus ont été testés en triplicata durant 4 jours consécutifs.

2.3.7 Application du test ELISA et compilation des résultats

2.3.7.1 Antigènes utilisés, sélection des sérums et reprises

Les patients de l'étude A ont été testés pour la présence d'anticorps dirigés contre les épitopes de la toxine recombinante A (rTcdA) et de la toxine recombinante B (rTcdB). C'est le très grand nombre d'échantillons à tester dans ce groupe ainsi que la quantité d'antigène disponible qui ont justifié cette décision. Quant aux patients de l'étude B, ils ont aussi été testés avec les antigènes rTcdA et rTcdB, mais également avec les toxines natives (TcdA et TcdB), les toxoïdes (iTcdA et iTcdB) ainsi que les deux préparations de flagelles (Cd et M).

En premier lieu, les derniers prélèvements de sérums (l'échantillon portant la lettre la plus éloignée dans l'alphabet) provenant des patients de l'étude A ont été testés. Par la suite, tous les prélèvements des patients dont le dernier échantillon prélevé était positif par ELISA ont été testés afin de détecter une éventuelle séroconversion (changement du statut sérologique du patient, c'est-à-dire que le patient séronégatif à l'admission devient séropositif au cours de l'étude pour l'un ou l'autre des anticorps recherchés). Tous les sérums de l'étude B (326 échantillons) ont été testés.

Selon les résultats des tests sérologiques pour chacun des antigènes, les patients peuvent appartenir à l'une des catégories suivantes : négatif, positif ou séroconversion. Une reprise du test ELISA a été effectuée sur les sérums dont le résultat était situé près de la valeur-seuil. La valeur moyenne des deux tests a été considérée au moment de l'analyse quand le second résultat était similaire au premier. Dans les cas où le deuxième résultat différait de façon importante, un troisième test était

réalisé. Lorsque trois tests indépendants donnaient trois résultats différents, le sérum était retiré de l'analyse. Le même algorithme a été utilisé pour les sérums dont les résultats étaient aberrants, par exemple lorsque tous les échantillons d'un même patient étaient fortement positifs à l'exception du deuxième prélèvement. Seulement 1,16% des patients n'ont pas été considérés lors de l'analyse pour ces raisons.

2.3.7.2 Contrôles positifs et négatifs

Un mélange (*pool*) de sérums fortement positifs au test de neutralisation a servi de contrôle positif pour le test ELISA. Ce *pool* a été constitué au tout début de l'étude, aliquoté puis congelé à -20°C afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats entre les tests. Le contrôle positif a été répété sur chacune des plaques, pour chacun des antigènes testés. Lorsque le contrôle positif donnait un résultat négatif, les résultats des sérums n'étaient pas compilés et la plaque entière était reprise.

Les quatre contrôles négatifs (voir section 2.3.5) ont également été préparés à partir de quatre pools de sérums ayant été analysés avec le test de neutralisation. Les mélanges de sérums négatifs ont été aliquotés et congelés à -20°C. Pour chacun des antigènes testés, une valeur-seuil de positivité a été calculée sur toutes les plaques à l'aide des 4 contrôles négatifs.

2.3.7.3 Soustraction du bruit de fond des sérums

Des études préliminaires nous ont permis de constater que le bruit de fond généré par les sérums dans le test ELISA était important et variait de façon considérable d'un échantillon à un autre. Le bruit de fond correspond au signal non-spécifique détecté lorsqu'un sérum est incubé dans un puits ne contenant aucun antigène de capture.

Chaque sérum a donc été testé en présence et en absence de l'antigène de capture. Le résultat net, c'est-à-dire la valeur de la soustraction entre le test avec l'antigène de capture et la mesure du bruit de fond, a été utilisé lors des analyses.

2.3.7.4 Compilation et traitement des résultats

Les valeurs de densité optique ($DO_{450-630}$) obtenues pour chacun des sérums (données brutes, bruit de fond, résultats nets, valeurs-seuil de positivité) ainsi que les informations sur les patients ont été compilées sous Excel (Microsoft Windows). Une macro programmée pour les besoins de l'étude nous a permis de traiter les résultats de façon rigoureuse et de minimiser les risques d'erreur lors des analyses.

2.4 Validation de l'ELISA

Suite à l'analyse de tous les sérums, nous avons voulu confirmer que l'ELISA était demeuré valide tout au cours de l'étude et que les résultats obtenus étaient fiables. Nous avons donc fait des tests de neutralisation de la cytotoxicité tels que décrits à la section 2.3.1 sur un groupe de 522 sérums, dont tous les sérums de l'étude B (n=326) ainsi que 196 sérums prélevés aléatoirement dans la banque d'échantillons de l'étude A. Un deuxième test de neutralisation a été réalisé pour 185 sérums choisis parmi le groupe de 522 échantillons mentionné ci-haut. Ces sérums ont été dilués 1:2 afin de vérifier s'il était possible d'augmenter la sensibilité du test de neutralisation tout en conservant une bonne spécificité. Les résultats des tests ELISA ont ensuite été comparés à ceux du test de neutralisation pour déterminer la sensibilité et la spécificité de l'ELISA pour la détection des anticorps contre rTcdB, TcdB et iTcdB.

Nous avons comparé pour ce groupe de sérums la méthode de calcul de la valeur-seuil présentée à la section 2.3.5 avec la méthode utilisée par Warny *et al.* (WARNY *et al.*, 1994). Leur protocole pour la mise au point d'un test ELISA détectant les anticorps sériques dirigés contre *C. difficile* est cité à quelques reprises dans la littérature (KYNE *et al.*, 2001, PÉCHINÉ *et al.*, 2005a, SOUGIOULTZIS *et al.*, 2005). Le test qu'ils utilisent pour la détection des anticorps dirigés contre la toxine A de *C. difficile* purifiée a été mis au point à l'aide de sérums provenant de patients avec une DACD. Les auteurs ont déterminé arbitrairement qu'un sérum était positif lorsque son résultat était supérieur à 5 fois le résultat obtenu dans un puits sans sérum (bruit de fond de la plaque).

2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistix 7 (Analytical Software). Le seuil de significativité α a été fixé à 0,05. On considérait qu'il existait une *tendance* vers une association significative lorsque les valeurs de p étaient situées entre 0,05 et 0,1. Les comparaisons entre les taux de séropositivité des patients des différents groupes ont été réalisées à l'aide du test du χ^2 de Pearson ou à l'aide du test exact de Fisher. Le test exact de Fisher a été utilisé lorsque la fréquence attendue d'au moins une cellule du tableau de contingence était inférieure à 5.

3. RÉSULTATS

3.1 Préparation des antigènes de capture

3.1.1 Purification des toxines A et B

La purification des toxines A et B a été réalisée à partir d'un surnageant d'une culture toxigène de *C. difficile*. Ce surnageant était fortement contaminé par les protéines provenant du milieu de culture et très peu concentré en toxines (Figure 4a). Les extraits de toxines ont été purifiés par passages successifs sur trois résines de chromatographies. La Figure 4b présente les extraits de toxines après la purification.

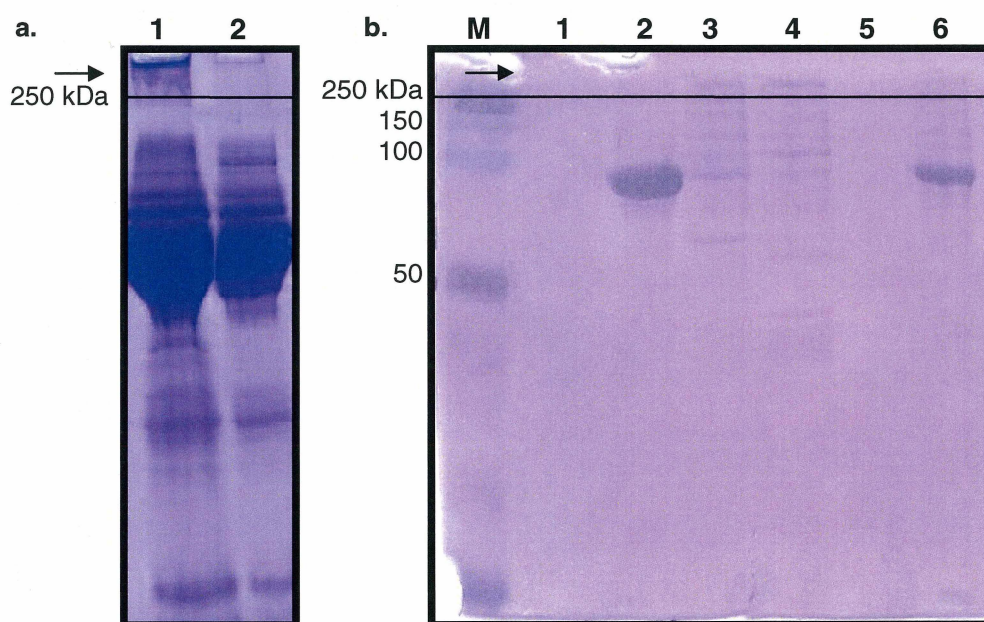


Figure 4. Purification des toxines à partir d'un surnageant de culture de *C. difficile*

a. 1 : Surnageant d'une culture de *C. difficile* toxigène, 2 : Milieu thioglycollate avec sérum

b. M : Marqueur Kaleidoscope (Bio-Rad), 1 : Éluion de la toxine A sur colonne Mono Q, 2 : Éluion des contaminants de l'extrait de toxines B sur Mono Q, 3-4 : Éluion de la toxine B sur Mono Q, 5 : Extrait de toxine A purifié, 6 : Extrait de toxine B purifié; —> : toxines (270-308 kDa)

Coloration des gels de polyacrylamide : bleu de Coomassie

La concentration en toxines et la pureté de chaque extrait ont été évaluées avec le test EIA de Meridian ainsi que par immunobuvardage western avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine A ou la toxine B (résultats non-disponibles). Les extraits (25 µl d'extrait non dilué) ont généré une réaction faiblement positive au test EIA. La limite de détection inférieure de ce test est de 1,4 ng/ml pour la toxine A et de 2,4 ng/ml pour la toxine B. Finalement, selon le test de Bradford, la concentration en protéines de chacun des extraits purifiés s'est avérée inférieure à 150 µg/ml.

3.1.2 Variation des conditions de production des toxines

Étant donné le faible rendement de la purification des toxines à partir d'un surnageant de culture, nous avons tenté d'identifier des conditions idéales pour la production des toxines A et B de *C. difficile* dans un milieu minimal. Les essais de production des toxines *in vitro* nous ont permis de déterminer que c'est une culture de 72 h sur gélose de la souche de référence ATCC 9689 repiquée dans un tampon PBS supplémenté avec 0,1% glucose et incubée durant 24 h à 37°C qui génère la plus grande quantité de toxines, tel que vérifié à l'aide du test EIA de Meridian. Les toxines produites ont été visualisées sur un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie (Figure 5a) et un immunobuvardage western (Figure 5b) a été effectué pour confirmer la présence spécifique des toxines A et B dans l'extrait. Les étapes de purification sur colonne de cette préparation de toxines n'ont pas permis de séparer les toxines A des toxines B ni de les concentrer suffisamment pour qu'elles puissent être utilisées pour réaliser tous les tests ELISA prévus dans le cadre de ce projet. Au total, environ 200 µl d'un mélange de toxines A et B d'une concentration de 2,6 mg/ml ont pu être produits.

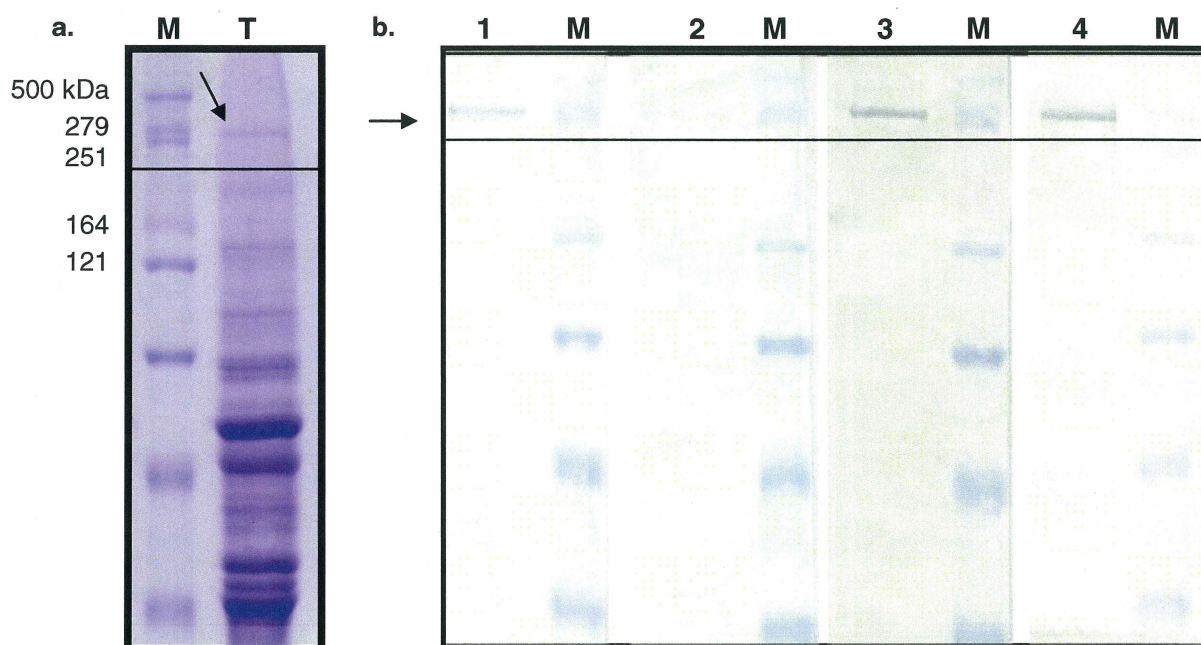


Figure 5. Production d'un extrait de toxines concentré dans un tampon sans protéines

a. T : extrait de toxines **b.** Immunobuv. western, détection avec 1 : anti-toxine A et anti-toxine B, 2 : anti-toxine A, 3 : anti-toxine B, 4 : sérum neutralisant anti-toxines A et B; M : Marqueur HiMark (Invitrogen); → : toxines A et B (270 et 308 kDa, respectivement)

3.1.3 Clonage du gène *cdtB* de la toxine binaire

Quatre constructions plasmidiques (20-3, 39-1, 39-2 et 39-3)⁵ contenant des fragments du gène *cdtB* ont été construites, répliquées et séquencées. Le séquençage a permis de vérifier l'intégrité des gènes clonés et d'identifier plusieurs variations ponctuelles (polymorphisme) par rapport à la séquence publiée (aucun décalage du cadre de lecture). La Figure 6 présente la comparaison entre la séquence en acides aminés attendue et celle obtenue lors du séquençage du gène inséré dans le vecteur.

⁵ Afin de simplifier la présentation, les constructions ont été numérotées de la façon suivante : chiffre correspondant au vecteur (pET-20b(+) = 20, pET-39b(+) = 39) suivi du chiffre associé à la portion du gène de la toxine binaire inséré (*binI* = 1, *binII* = 2, *binIII* = 3)

Originale	1	EIVNEDILPNNGLMGYYFTDEHFKDLKLMAPIKDGNLKFEEKKVDKLLDKSDVKSIRW	60
Clone	1	60
Originale	61	TGRIIPSKDGEYTLSTDRDDVLMQVNTTESTISNTLKVNMMKKGKEYKVRIELQDKNLGSID	120
Clone	61	120
Originale	121	NLSSPNLYWELDGMKKIIPENLFLRDYSNIEKDDPFIPNNNFDPKLMSDWEDEDLDTD	180
Clone	121	180
Originale	181	NDNIPDSYERNGYTIKDLIAVKWEDSFAEQGYKKYVSNYLESNTAGDPYTDYEKASGSFD	240
Clone	181	240
Originale	241	KAIKTEARDPLVAAYPIVGVGMEKLIISTNEHASTDQGKTVSRATTNSKTESNTAGVSVN	300
Clone	241D	300
Originale	301	VGYQNGFTANVTTNYSHTTDNSTAVQDSNGESWNTGLSINKGESAYINANVRYNTGTAP	360
Clone	301S.....	360
Originale	361	MYKVTPTNLVLDGDTLSTIKAQENQIGNNLSPGDTPPKGLSPLALNTMDQFSSRLIPI	420
Clone	361	420
Originale	421	NYDQLKKLDAGKQIKLETTQVSGNFGTKNSSGQIVTEGNSWSDYISQIDSISASIILDTE	480
Clone	421	480
Originale	481	NESYERRVTAKNLQDPEDKTPELTIGEAEKAFGATKKDGLLYFNDIPIDESCVELIFDD	540
Clone	481	540
Originale	541	NTANKIKDSLKTLSDKKIYNVKLERGMNILIKTPTYFTNFDDYNNYPSTWSNVNTTNKDG	600
Clone	541Q..	600
Originale	601	LQGSANKLNGETKIKIPMSELKPYKRYVFSGYSKDPLTSNSIIVKIKAKEEKT DYLVPEQ	660
Clone	601	660
Originale	661	GYTKFSYEFETTEKDSSNIEITLIGSGTTYLDNLSITELNSTPEILDEPEVKIPTDQEII	720
Clone	661M	720
Originale	721	DAHKIYFADLNFNPSTGNTYINGMYFAPTQTNKEALDYIQKYRVEATLQYSGFKDIGTKD	780
Clone	721	780
Originale	781	KEMRNYLGDPNQPKTNYVNLRSYFTGGENIMTYKKLRIYAITPDDRELLVLVSVD	834
Clone	781	..T.....S.....M.....Q.....	834

Figure 6. Comparaison des séquences en acides aminés des clones avec la séquence originale publiée

Originale : séquence originale (numéro d'accension AF271719); Clone : séquence des protéines clonées (point (.) = acide aminé identique, rose = substitution chez 20-3 seulement, orange = 39-1 seulement, bleu = 39-2 seulement, noir = tous les clones ainsi que les inserts amplifiés par PCR); Position 1 : début BinI, position 168 = début BinII, position 268 : début BinIII

Par la suite, les plasmides ont été transformés avec succès dans la souche d'expression *E. coli* HMS174. Plusieurs conditions pour optimiser l'induction et l'expression des protéines recombinantes couplées à une étiquette 6X-His ont été essayées. Aucune d'entre elles n'a permis de surexprimer l'une des protéines

recombinantes, comme on peut l'observer sur les gels d'électrophorèse de la Figure 7 (production de BinII) et les immunobuvardages western présentés à la Figure 8.

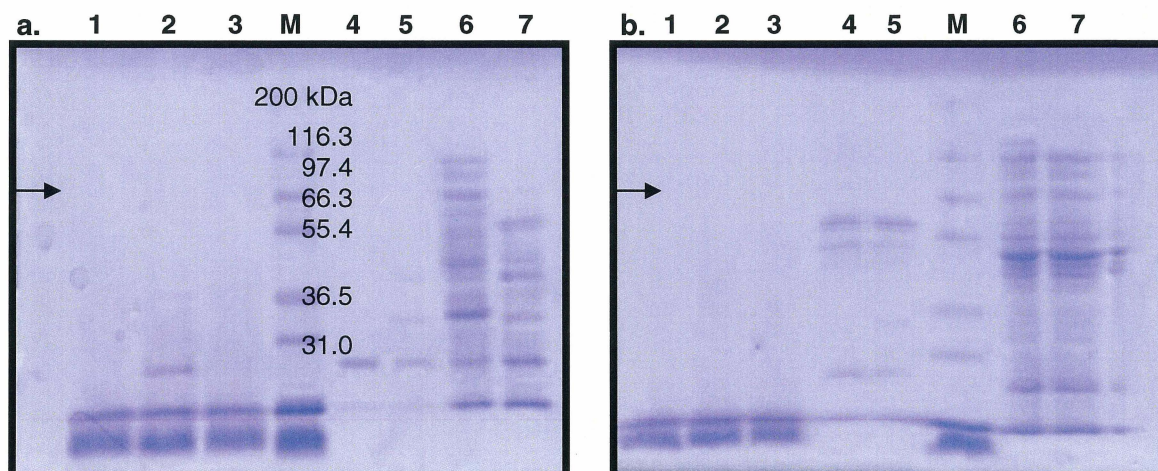


Figure 7. Production de la protéine recombinante BinII dans le vecteur pET-39b(+)

a. Contrôle d'induction L **b.** Clone 39-2, 1 : Milieu de culture, 2 : Protéines excrétées (induit, i), 3 : Protéines excrétées (non-induit, ni), 4 : Espace périplasmique (i), 5 : Espace périplasmique (ni), 6 : Protéines insolubles (i), 7 : Protéines insolubles (ni); M : Marqueur Mark12 (Invitrogen); → localisation probable de BinII (75 kDa)

La détection par immunobuvardage western des protéines Bin clonées (Figure 8) a été effectuée à l'aide d'un anticorps primaire anti-étiquette His. Les puits 1 à 8 des deux figures contiennent les préparations des protéines de l'espace périplasmique et les extractions des protéines insolubles réalisées sur des cellules induites et non-induites (clones 20-3, 39-1, 39-2 et 39-3). Seuls les puits 4 et 7 de la Figure 8a présentent des bandes d'une taille inférieure à 35 kDa. Cette réaction semble non-spécifique puisqu'aucune des protéines recombinantes ne devrait présenter cette taille. De plus, le puits 4 contient un contrôle non-induit, c'est-à-dire une préparation dans laquelle l'expression d'une protéine couplée à une étiquette His ne devrait pas survenir. Les puits 9 contiennent le contrôle d'induction L, fourni avec les cellules d'expression. Ce contrôle

sert à vérifier que le protocole d'induction avec l'IPTG a permis l'expression des protéines couplées à une étiquette de purification (dans le cas présent, une étiquette His). La protéine qui devrait être surexprimée par le contrôle d'induction L a une taille de 32,2 kDa. On remarque effectivement qu'une bande intense de cette taille est détectée dans les puits 9 par l'anticorps anti-étiquette His. La nature des autres bandes (de plus faible intensité) qui sont révélées dans les puits 9 des deux figures nous est inconnue. La détection de l'expression de la protéine contrôle nous confirme que le protocole d'induction utilisé était efficace.

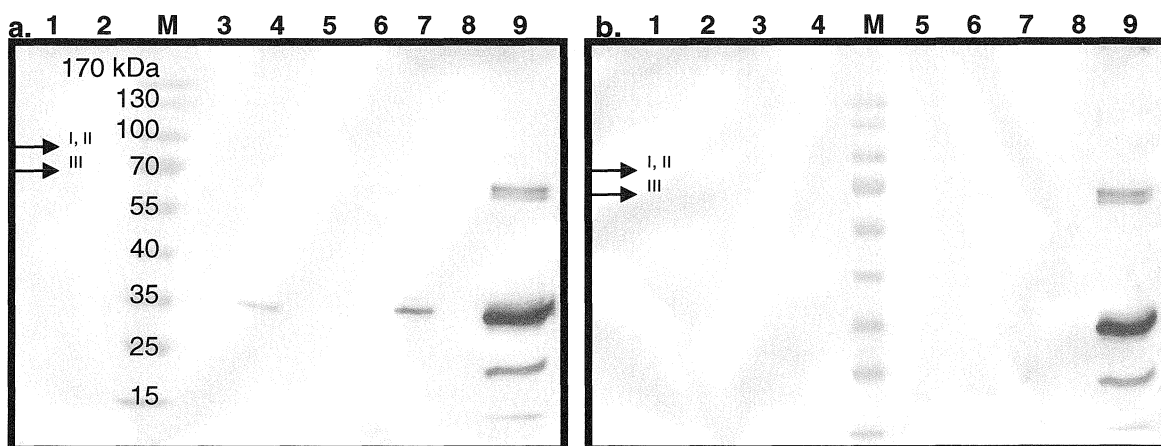


Figure 8. Production des protéines recombinantes BinI, BinII et BinIII

a. 1 : 20-3 espace périplasmique (induit, i), 2 : 20-3 espace périplasmique (non-induit, ni), 3 : 20-3 protéines insolubles (i), 4 : 20-3 protéines insolubles (ni), 5 : 39-1 espace périplasmique (i), 6 : 39-1 espace périplasmique (ni), 7 : 39-1 protéines insolubles (i), 8 : 39-1 protéines insolubles (ni), 9 : contrôle d'induction L (i) **b.** 1 : 39-2 espace périplasmique (i), 2 : 39-2 espace périplasmique (ni), 3 : 39-2 protéines insolubles (i), 4 : 39-2 protéines insolubles (ni), 5 : 39-3 espace périplasmique (i), 6 : 39-3 espace périplasmique (ni), 7 : 39-3 protéines insolubles (i), 8 : 39-3 protéines insolubles (ni), 9 : contrôle d'induction L (i); M : Marqueur PageRuler (Fermentas); →ⁿ localisation probable de BinI (95 kDa), BinII (75 kDa) et BinIII (64 kDa) ; Détection : anticorps anti-étiquette His

Nous avons posé l'hypothèse qu'il était possible que les protéines couplées à une étiquette histidine soient produites à de très faibles concentrations et qu'un

enrichissement s'avère nécessaire afin de les visualiser sur gel ou les détecter par immunobuvardage. Ainsi, malgré les résultats décevants obtenus suite à la réalisation du protocole de production et de purification des protéines clonées, nous avons passé les extraits produits à partir des cultures induites et non-induites sur une résine de nickel. Toutes les fractions ont été mélangées ensemble avant d'être passées sur la colonne pour s'assurer de récupérer toutes les protéines. Le gel présenté à la Figure 9 a été réalisé afin de faire le suivi les étapes de purification. Aucune bande présente sur le gel dans les fractions purifiées (pistes 5 et 8) ne correspond à l'une des protéines recombinantes (BinI: 95 kDa, BinII: 75 kDa et BinIII: 64 kDa).

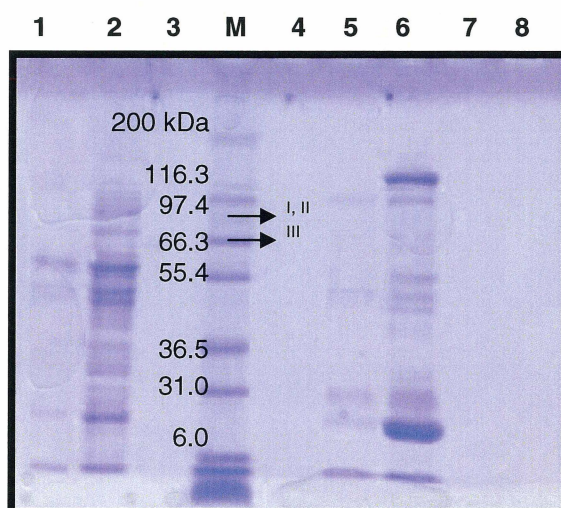


Figure 9. Purification des protéines clonées sur résine de nickel

1 : *Flow-through* (fraction non-induite), 2 : *Flow-through* (fraction induite), 3 : Dernier lavage (ni), 4: Dernier lavage (i), 5 : Éluion concentrée (i), 6 : Éluion concentrée (ni), 7 : Pool fractions tardives (ni), 8 : Pool fractions tardives (i); M : Marqueur Mark12 (Invitrogen); \rightarrow^n localisation probable de BinI (95 kDa), BinII (75 kDa) et BinIII (64 kDa)

3.1.4 Expression et purification de la protéine FliD

La protéine FliD a été clonée par le groupe du Dr Collignon dans *E. coli* BL21. L'ajout d'IPTG a permis d'exprimer une protéine de fusion GST-FliD d'une taille de 82 kDa (GST : 26 kDa, FliD : 56 kDa). Environ 0,5 ml d'une préparation purifiée de FliD concentrée (0,4 mg/ml) a pu être préparée à partir d'une culture de 4 litres. Sur le gel de polyacrylamide de la Figure 10a, on remarque la présence d'une forte bande

correspondant à la protéine FliD (*). On observe également que cette préparation ne contient que très peu de contaminants, qui sont probablement des protéines de *E. coli* ayant été co-purifiées sur la résine Glutathione Sepharose ou des formes tronquées de FliD. Afin de confirmer que la protéine surexprimée vue sur gel est bien la protéine FliD, nous avons réalisé un immunobuvardage western sur une préparation de la protéine FliD encore couplée à l'étiquette GST (Figure 10b). Un anticorps anti-GST a été utilisé pour la détection. Dans le puits 3 (élution de la protéine GST-FliD), on remarque la présence d'une bande située entre les marqueurs de poids moléculaire de 72 et 95 kDa. Il s'agit probablement de la protéine de fusion GST-FliD. Les deux autres bandes sont possiblement des dimères de GST ou encore des protéines GST-FliD tronquées. Enfin, les puits 1 et 2 contiennent un échantillon des lavages réalisés pour éluer la GST de la résine suite au clivage sur colonne de la protéine FliD.

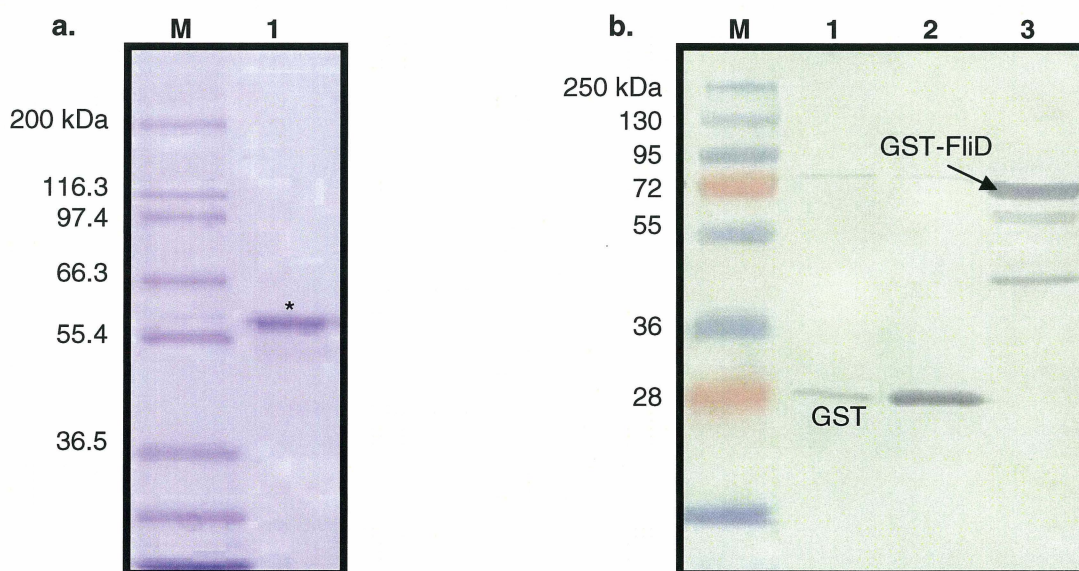


Figure 10. Purification de la protéine FliD sur résine Glutathione Sepharose

a. M : Marqueur Mark12 (Invitrogen), 1 : FliD purifiée (*) **b.** Immunobuvardage western (anticorps anti-GST, 1:10 000): M : Marqueur PageRulerPlus (Fermentas), 1-2 : Élution de l'étiquette GST, 3 : Élution de la protéine de fusion FliD-GST, Détection : anticorps anti-étiquette GST

3.2 Mise au point et validation du test ELISA

3.2.1 Préparation d'un groupe contrôle

Le test de neutralisation de la cytotoxicité a été réalisé sur 108 sérums prélevés aléatoirement parmi les échantillons du groupe A. Au moment de la lecture à 24 h, 88 sérums n'avaient pas neutralisé l'effet cytotoxique d'un surnageant d'une culture de *C. difficile* et 20 sérums neutralisaient partiellement ou complètement l'effet cytotoxique. Tous les sérums neutralisants ainsi que 12 sérums négatifs ont été sélectionnés puis titrés. Parmi les 32 sérums choisis, 14 étaient négatifs selon les critères retenus (voir section 2.3.1), 11 présentaient un titre de neutralisation intermédiaire et 7 étaient fortement positifs. Ce sont les sérums de ce groupe qui ont servi à ajuster les paramètres de l'ELISA. La Figure 11 présente des résultats typiques obtenus lors du test de neutralisation.

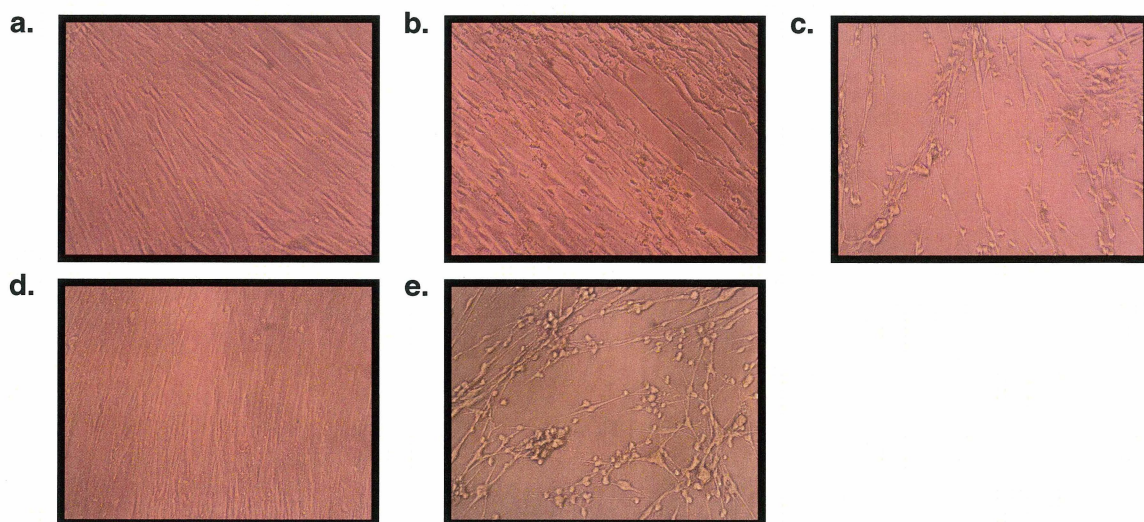


Figure 11. Résultats du test de neutralisation de la cytotoxicité sur cellules MRC-5

a. Sérum neutralisant (cellules intactes) **b.** Sérum intermédiaire **c.** Sérum non-neutralisant (cellules arrondies) **d.** Cellules sans toxines **e.** Cellules avec toxines (contrôle sans anticorps)

3.2.2 Ajustement des paramètres de l'ELISA

Chacune des étapes de notre test ELISA a été ajustée afin que les résultats des sérums corrélaient avec le test de neutralisation. Les résultats des tests ayant servi à la mise au point de l'ELISA se trouvent dans les Figures 12 à 16. D'abord, on observe sur la Figure 12 que les sérums négatifs au test de neutralisation présentent toujours une faible $DO_{450-630}$ ($<1,0$), peu importe la concentration d'antigène de capture rTcdB utilisée. On constate également que la distinction entre les sérums positifs et les sérums négatifs est un peu plus nette lorsqu'on utilise une concentration d'antigène de capture supérieure à 0,5 $\mu\text{g/ml}$. L'ensemble des tests a donc été réalisé en utilisant une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ de l'antigène de capture rTcdB.

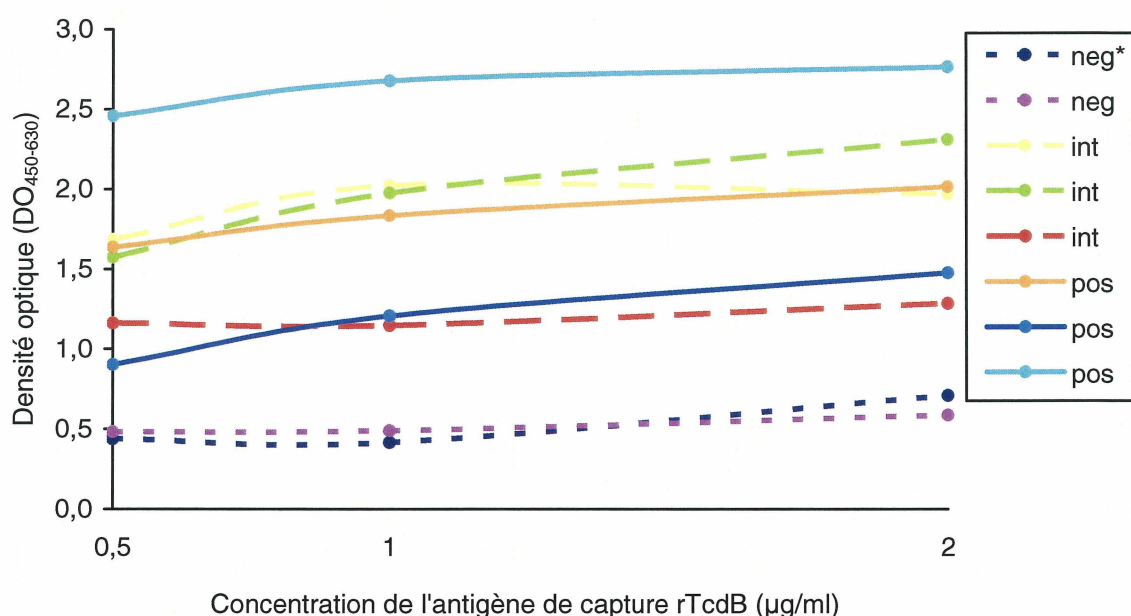


Figure 12. Résultats des tests ELISA ($DO_{450-630}$) pour 8 sérums du groupe contrôle en fonction de la concentration de l'antigène de capture rTcdB

*neg : négatif, int : intermédiaire, pos : positif

Le choix de la dilution des sérums à utiliser dans l'ELISA est appuyé par les résultats présentés à la Figure 13. Certains sérums intermédiaires ou positifs au test de neutralisation présentent des $DO_{450-630}$ très faibles ($<1,0$) dans le test ELISA lorsqu'on les dilue 1:300 et 1:900. L'utilisation de sérums dilués 1:100 semble nous permettre de distinguer de façon claire les sérums positifs, même faibles, des sérums négatifs.

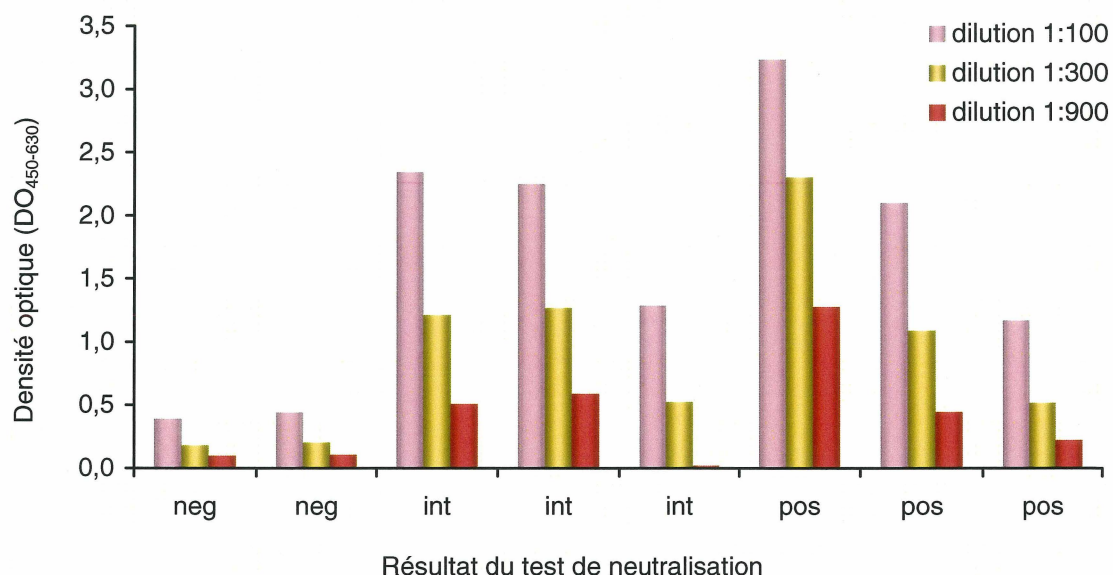


Figure 13. Résultats des tests ELISA ($DO_{450-630}$) pour 8 sérums du groupe contrôle en fonction de la concentration du sérum

Antigène de capture utilisé : 1 μ g/ml rTcdB

Nous avons ensuite évalué 2 solutions de blocage (5% lait écrémé vs 3% BSA dans le tampon TBS 0,05% Tween) afin d'identifier celle qui permettait le mieux de réduire le bruit de fond causé par l'adsorption non-spécifique des anticorps sériques sur les puits. Tel qu'observé sur la Figure 14, le blocage avec une solution de lait génère des valeurs de $DO_{450-630}$ élevées ($>1,0$) pour l'ensemble des sérums. L'utilisation de ce bloqueur rend impossible la distinction entre les sérums négatifs et les sérums positifs

selon le test de neutralisation. Certains sérums semblent présenter des anticorps se liant à des composantes du lait et cette réaction masque la détection des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène de capture. D'autre part, on remarque qu'avec l'utilisation d'une solution de BSA, les sérums négatifs au test de neutralisation présentent des $DO_{450-630}$ brutes inférieures à 1,0 alors que les sérums intermédiaires et positifs en neutralisation ont un résultat supérieur à 1,0 dans le test ELISA. Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de la BSA comme protéine de blocage.

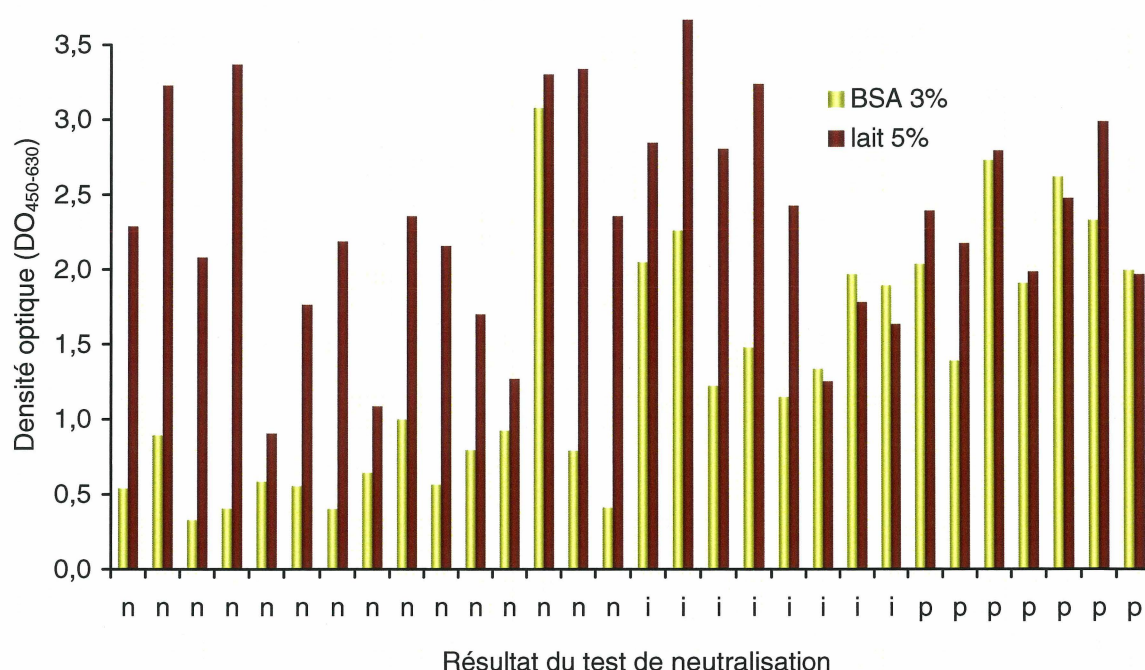


Figure 14. Résultat des tests ELISA ($DO_{450-630}$) pour 32 sérums du groupe contrôle selon le bloqueur utilisé

Antigène de capture utilisé : 1 $\mu\text{g/ml}$ rTcdB; n : négatif, i : intermédiaire, p : positif

Une fois le choix du bloqueur effectué, nous avons dû déterminer la durée de l'étape de blocage. La Figure 15 présente la courbe de la $DO_{450-630}$ du bruit de fond pour 7 sérums en fonction du temps de blocage. Le test a été réalisé sans recouvrir au préalable les puits avec un antigène de capture. À la lueur de ces résultats, nous avons

choisi d'incuber les puits avec la solution de blocage durant 3 h. Cela nous a permis de diminuer significativement le bruit de fond tout en maintenant la durée totale du test ELISA à une journée. Malheureusement, comme on le remarque sur la Figure 16, le bruit de fond s'est avéré variable entre les sérums et présentait des valeurs élevées ($>0,5$) pour certains spécimens. Nous avons donc décidé de mesurer systématiquement la valeur du bruit de fond de chaque sérum et de la soustraire à la valeur obtenue dans le test avec l'antigène de capture. La valeur nette ainsi obtenue nous semblait plus représentative de la spécificité du sérum pour l'antigène testé.

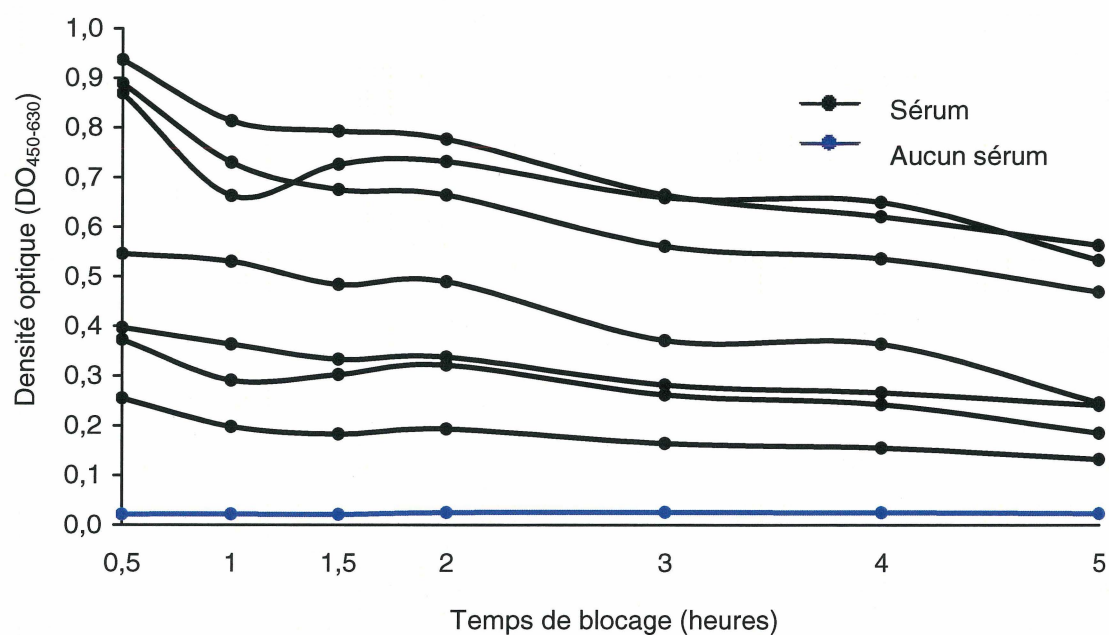


Figure 15. Bruit de fond de l'ELISA ($DO_{450-630}$) en fonction du temps de blocage avec un tampon 3% BSA pour 7 sérums du groupe contrôle

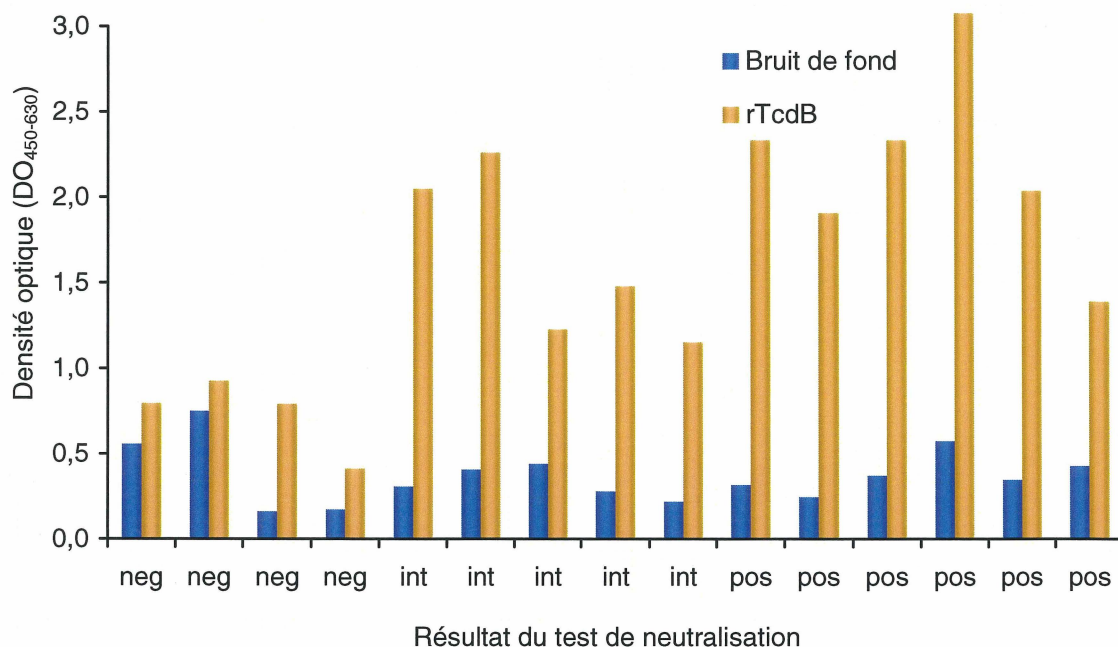


Figure 16. Mesure du bruit de fond (DO₄₅₀₋₆₃₀) en absence d'antigène de capture et en présence de 1 µg/ml rTcdB pour 15 sérums du groupe contrôle

3.2.3 Sensibilité, spécificité et reproductibilité de l'ELISA

La sensibilité et la spécificité du test ELISA pour la détection des anticorps contre rTcdB – telles que calculées en comparant les résultats de 12 reprises du test ELISA avec les résultats obtenus au test de neutralisation pour 21 sérums – sont de 100% et de 92,9%, respectivement. Le Tableau 4 présente les résultats des tests ELISA réalisés en triplicata durant 4 jours sur 14 sérums négatifs et 7 sérums fortement positifs par neutralisation (12 reprises de l'ELISA par échantillon). Les reprises de chacun des sérums concordaient entre elles. Un seul sérum négatif au test de neutralisation s'est avéré positif par ELISA.

Tableau 4. Distribution des résultats des tests ELISA pour l'anticorps anti-rTcdB réalisés en triplicatas durant 4 jours sur 21 sérums du groupe-contrôle

Résultat de l'ELISA (Anticorps anti-rTcdB)	Résultat du test de neutralisation de la cytotoxicité	
	Positif	Négatif
Positif	84	12
Négatif	0	156

Nous avons ensuite réalisé des tests de reproductibilité avec 11 sérums inconnus (12 reprises par échantillon). Les résultats détaillés de ce test se trouvent dans le Tableau 5. Avec le test ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre rTcdA, 4 sérums sur 11 ont donné des résultats reproductibles à chacun des 12 essais, 6 sérums ont présenté 1 ou 2 résultats discordants lors des essais et un seul sérum a été impossible à typer. Seulement deux sérums ont présenté des différences dans les résultats du test ELISA pour la détection des anticorps contre rTcdB. Dans l'ensemble, les résultats des sérums discordants se situaient tout près de la limite de positivité.

Tableau 5. Distribution des résultats des tests ELISA réalisés en triplicatas durant 4 jours sur 11 sérums inconnus

Sérum	Anticorps anti-rTcdA		Anticorps anti-rTcdB		Résultat
	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	
1	0	12 (0,2 ± 0,3)	0	12 (0,7 ± 0,1)	A ⁻ B ⁻
2	2 (2,3 ± 1,7)	10 (0,2 ± 0,4)	0	12 (0,4 ± 0,1)	A ⁻ B ⁻
3	5 (1,2 ± 0,2)	7 (-0,2 ± 1,0)	0	12 (0,5 ± 0,1)	A [?] B ⁻
4	0	12 (0,2 ± 0,4)	12 (1,3 ± 0,1)	0	A ⁻ B ⁺
5	1 (2,9)	11 (0,2 ± 0,2)	12 (2,0 ± 0,4)	0	A ⁻ B ⁺
6	11 (2,6 ± 0,6)	1 (-6,5)	12 (2,1 ± 0,6)	0	A ⁺ B ⁺
7	1 (1,4)	11 (0,1 ± 0,4)	2 (1,1 ± 0,1)	10 (0,7 ± 0,1)	A ⁻ B ⁻
8	2 (1,1 ± 0,1)	10 (0,6 ± 0,3)	12 (2,1 ± 0,4)	0	A ⁻ B ⁺
9	0	12 (0,4 ± 0,2)	3 (1,5 ± 0,4)	9 (0,7 ± 0,3)	A ⁻ B ⁻
10	1 (1,0)	11 (0,2 ± 0,3)	0	12 (-0,1 ± 0,2)	A ⁻ B ⁻
11	12 (1,5 ± 0,3)	0	12 (2,7 ± 0,8)	0	A ⁺ B ⁺

Nombre de sérums (résultat de l'ELISA sur valeur-seuil de positivité ± écart type)

3.2.4 Validation du test ELISA

Suite aux analyses des échantillons de l'étude, la validation des tests ELISA a été effectuée sur un groupe de 522 sérums. Nous avons déterminé que la sensibilité et la spécificité des tests avec les antigènes de la toxine B étaient respectivement de 95,7% et 60,4% pour rTcdB, 97,9% et 77,3% pour TcdB et 97,9% et 80,4% pour iTcdB. Le détail de la distribution des résultats pour chaque antigène se trouve dans le Tableau 6. Ce tableau présente aussi les résultats que nous aurions obtenus si nous avions utilisé, comme dans la littérature, une valeur-seuil fixe. De cette manière, les valeurs de sensibilité et de spécificité obtenues sont respectivement de 100% et 14,1% pour rTcdB, 97,9% et 44,2% pour TcdB et 100% et 48,0% pour iTcdB.

Tableau 6. Corrélations entre les résultats du test de neutralisation de la cytotoxicité et l'ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre rTcdB, TcdB et iTcdB lors de la validation du test

Résultat de l'ELISA	Résultat du test de neutralisation de la cytotoxicité			
	Notre méthode ¹		Littérature ²	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Anticorps contre rTcdB				
Positif	45	188	47	408
Négatif	2	287	0	67
Anticorps contre TcdB				
Positif	46	108	46	265
Négatif	1	367	1	210
Anticorps contre iTcdB				
Positif	46	93	47	247
Négatif	1	382	0	228

¹ : mesure d'une valeur-seuil, ² : valeur-seuil équivalente à 5 fois la valeur du bruit de fond

3.3 Résultats des tests ELISA sur les sérums de l'étude

3.3.1 Étude A

3.3.1.1 Distribution des patients

Les patients du projet FRSQ proviennent de 6 hôpitaux (sites A à F). Au total, 5244 individus ont initialement été enrôlés dans l'étude. Les patients ne répondant pas aux critères d'inclusion, ceux dont les questionnaires étaient incomplets ou encore ceux pour qui on ne disposait pas d'au moins un échantillon testable ont été exclus de l'étude (1277 sujets). Les 3967 patients remplissant les critères d'inclusion et dont les sérums ont été testés se distribuent de la façon suivante dans les sites de l'étude: A (n=701), B (n=571), C (n=826), D (n=794), E (n=340), F (n=735). Les patients sont regroupés selon

la survenue ou non d'une colonisation ou d'une infection (DACD) par *C. difficile*. Durant l'étude (14 mois), il y a au total 3501 (88,2%) patients qui n'ont pas contracté de colonisation ou d'infection à *C. difficile* (NCNC), 177 (4,5%) patients qui sont devenus colonisés durant l'hospitalisation et 81 (2,0%) cas d'infection nosocomiale. Parmi les 208 patients restants, 156 (3,9%) étaient déjà colonisés lors de leur entrée dans l'étude et 52 (1,3%) avaient une DACD au moment de leur admission.

3.3.1.2 Résultats de l'ELISA

Les 3967 patients de cette étude ont été testés par ELISA pour la présence d'anticorps dirigés contre la portion C-terminale recombinante des toxines A et B (rTcdA et rTcdB). La distribution des résultats de l'ELISA pour les patients dans les 6 sites de l'étude est présentée dans le Tableau 7 et sur la Figure 17.

Tableau 7. Distribution des résultats de l'ELISA des patients de l'étude A par site

Résultat	A (n=701)	B (n=571)	C (n=826)	D (n=794)	E (n=340)	F (n=735)	Total (n=3967)
rTcdA ⁺ B ⁻	61 (8,7)	31 (5,4)	89 (10,8)	79 (9,9)	23 (6,8)	60 (8,2)	343 (8,6)
rTcdA ⁺ B ⁺	152 (21,7)	93 (16,3)	124 (15,0)	128 (16,1)	60 (17,6)	143 (19,5)	700 (17,6)
rTcdA ⁺	137 (19,5)	60 (10,5)	167 (20,2)	153 (19,3)	44 (12,9)	120 (16,3)	681 (17,2)
rTcdB ⁺	228 (32,5)	122 (21,4)	202 (24,5)	202 (25,4)	81 (23,8)	203 (27,6)	1038 (26,2)
rTcdA ⁺ B ⁺	76 (10,8)	29 (5,1)	78 (9,4)	74 (9,3)	21 (6,2)	60 (8,2)	338 (8,5)
rTcdA ⁻ B ⁻	412 (58,8) ^A	418 (73,2) ^B	535 (64,8)	513 (64,6)	236 (69,4)	472 (64,2)	2586 (65,2)

Nombre de patients (%); différences significatives par rapport aux autres sites, ^A: p=0,0001,

^B: p<0,0001

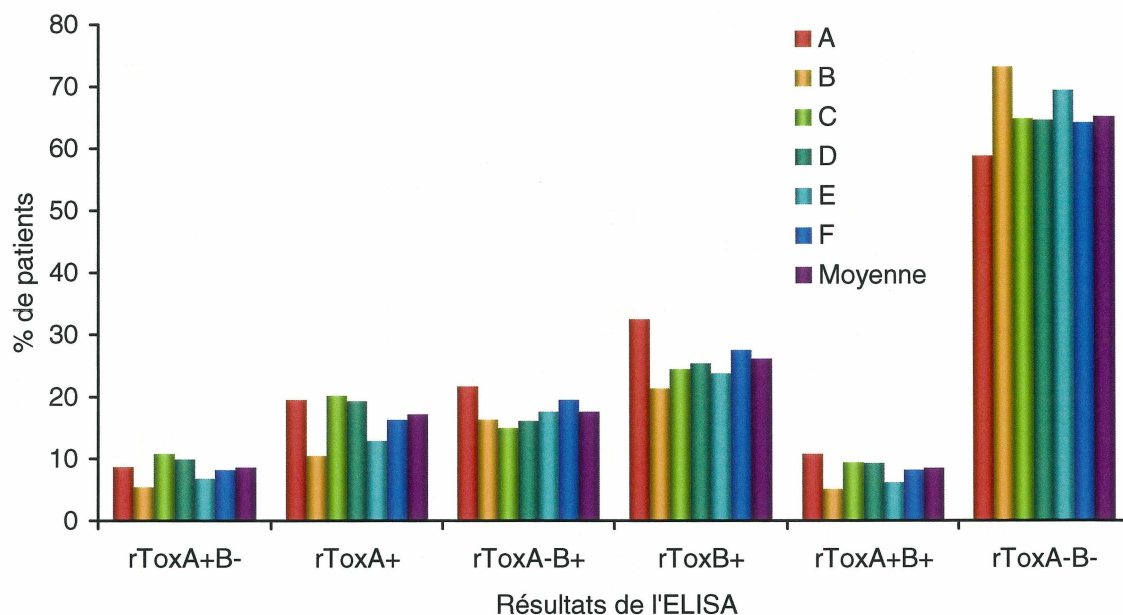


Figure 17. Distribution des résultats de l'ELISA des patients de l'étude A par site

Dans la population à l'étude, 34,8% des patients possèdent des anticorps sériques dirigés contre rTcdA et/ou rTcdB. Seulement 8,5% de ces patients sont séropositifs pour la présence d'anticorps dirigés contre les deux antigènes. Une réponse positive contre rTcdA est détectée chez 17,2% des patients et on observe une réponse positive contre rTcdB chez 26,2% des individus. Les différences entre les proportions obtenues pour chacun des sites ne sont généralement pas statistiquement significatives, sauf pour les sites A et B. Le site A présente moins de patients séronégatifs que la moyenne des sites ($p=0,0001$) alors qu'on retrouve une plus grande proportion de séronégatifs chez les patients du site B ($p<0,0001$). À cause de la faible prévalence des colonisés et des cas, nous avons considéré qu'il était tout de même approprié de regrouper les 6 hôpitaux lors de l'analyse des résultats.

Les résultats du test sur les sérums prélevés à l'entrée dans l'étude selon la présence à l'admission ou non ou la survenue au cours de l'hospitalisation ou non d'une colonisation ou d'une infection par *C. difficile* sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Distribution des résultats de l'ELISA du sérum prélevé à l'admission en fonction du statut des patients

Résultat	NCNC (n=3501)	Colonisé		DACD		Total (n=3967)
		Adm. ¹ (n=156)	Noso. ² (n=177)	Adm. (n=52)	Noso. (n=81)	
rTcdA⁺B⁻	300 (8,6)	12 (7,7)	14 (7,9)	10 (19,2)	7 (8,6)	343 (8,6)
rTcdA⁺B⁺	591 (16,9)	38 (24,4)	42 (23,7)	11 (21,2)	18 (22,2)	700 (17,6)
rTcdA⁺	592 (16,9)	26 (16,7)	35 (19,8)	14 (26,9) ^B	14 (17,3)	681 (17,2)
rTcdB⁺	883 (25,2)	52 (33,3) ^A	63 (35,6) ^A	15 (28,8)	25 (30,9)	1038 (26,2)
rTcdA⁺B⁺	292 (8,3)	14 (9,0)	21 (11,9)	4 (7,7)	7 (8,6)	338 (8,5)
rTcdA⁺B⁻	2318 (66,2)	92 (59,0)	100 (56,5) ^A	27 (51,9) ^A	49 (60,5)	2586 (65,2)

Nombre de patients (%); différences significatives par rapport aux patients NCNC, ^A: p<0,05, ^B: p=0,06 (tendance); ¹: à l'admission, ²: nosocomial

La proportion de patients séronégatifs pour la présence d'anticorps contre rTcdA et rTcdB lors de l'admission dans l'étude est significativement plus élevée chez les patients qui ne seront pas infectés ou colonisés au cours de l'étude (NCNC) que chez les patients qui deviendront colonisés (p<0,01) et que chez ceux qui avaient déjà une DACD lors du prélèvement du premier sérum (p=0,03). Au moment de l'enrôlement, une plus grande proportion de patients colonisés (à l'admission et nosocomiaux) que de patients NCNC ont des anticorps contre rTcdB (p=0,02 et p<0,01, respectivement). Les différences entre les autres groupes ne sont pas statistiquement significatives.

Il n'y a pas de différences significatives entre les taux de prévalence des anticorps dirigés contre rTcdA et/ou rTcdB des patients colonisés au moment de leur entrée dans l'étude et ceux des patients qui sont devenus colonisés au cours de l'étude. Par contre, les patients qui avaient une DACD à l'admission *tendent* à avoir plus souvent des anticorps contre rTcdA que les patients du groupe NCNC ($p=0,06$) et cette tendance ne se retrouve pas chez les patients qui ont acquis une DACD lors de l'hospitalisation.

Certains patients ($n=171$) ont fait une séroconversion au cours de l'étude, c'est-à-dire qu'ils étaient d'abord séronégatifs puis sont devenus séropositifs pour la présence de l'un ou l'autre des anticorps recherchés. Le Tableau 9 présente les taux de séroconversion en fonction du statut clinique pour les patients qui étaient séronégatifs lors de leur entrée dans l'étude.

Tableau 9. Taux de séroconversion en fonction du statut des patients

Séroconversion	NCNC	Colonisé		DACD		Total
		Adm.	Noso.	Adm.	Noso.	
rTcdA	78/2909 (2,7)	4/130 (3,1)	6/142 (4,2)	1/38 (2,6)	8/67 (11,9) ^{A,B}	96/3286 (3,0)
rTcdB	66/2618 (2,5)	4/104 (3,8)	7/114 (7,0) ^A	0/37 (0)	10/56 (17,9) ^{A,B,C}	88/2929 (3,0)
rTcdA et rTcdB	7/2318 (0,3)	1/92 (1,1)	2/100 (2,0) ^A	0/27 (0)	3/49 (6,1) ^A	13/2586 (0,5)

Nombre de séroconversions sur total des séronégatifs (%); différences statistiquement significatives ^A: par rapport aux NCNC, $p \leq 0,02$, ^B: par rapport aux colonisés à l'admission, Fisher $p \leq 0,02$, ^C: par rapport aux DACD à l'admission, Fisher $p=0,01$

Nous avons comparé le statut clinique avec la survenue d'une séroconversion contre les antigènes rTcdA et/ou rTcdB. D'abord, les taux de séroconversion des

patients qui sont devenus colonisés (colonisés nosocomiaux) sont significativement plus élevés que ceux des NCNC pour rTcdB ($p=0,02$) et pour les deux antigènes ($p=0,01$). De plus, les taux de séroconversion des patients ayant développé une DACD lors de l'étude sont significativement plus élevés que ceux des NCNC pour rTcdA, pour rTcdB et pour les deux antigènes ($p<0,0001$). Les patients ayant développé une DACD lors de l'étude ont également des taux de séroconversion pour rTcdA (Fisher $p=0,02$) et pour rTcdB (Fisher $p=0,004$) significativement plus élevés que les patients qui étaient colonisés au moment de l'enrôlement. Enfin, les patients ayant développé une DACD lors de l'étude ont fait significativement plus de séroconversions pour rTcdB que les patients qui présentaient une DACD à l'admission (Fisher $p=0,01$). Les taux de séroconversion chez les colonisés ou les infectés (DACD) nosocomiaux sont similaires entre les 6 sites de l'étude ($p>0,05$).

Parmi les 466 isolats isolés chez les colonisés et les cas, 416 ont été typées par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Le Tableau 10 présente la distribution des patients séropositifs pour les antigènes rTcdA et/ou rTcdB selon le profil PFGE de la souche isolée (pulsovar A ou tout autre pulsovar).

Tableau 10. Séropositivité en fonction du pulsovar chez les porteurs d'une souche

Pulsovars	rTcdA ⁺	rTcdB ⁺	rTcdA ⁺ B ⁺
A (n=146)	25 (17,1) ^A	36 (24,7)	15 (10,2)
Autres (n=270)	27 (10,0)	67 (24,8)	23 (8,5)
Total (n=416)	52 (12,5)	103 (24,8)	38 (9,1)

Nombre de patients séropositifs (%); ^A: différence statistiquement significative par rapport aux porteurs d'une souche d'un autre pulsovar, $p=0,04$

Les patients porteurs des souches appartenant au pulsovar A, le profil caractéristique des souches hypervirulentes BI/NAP1/027, ont une plus grande proportion de séropositifs contre rTcdA que les porteurs des souches des autres pulsovars ($p=0,04$).

Tel que détaillé dans le Tableau 11, aucune corrélation significative n'est observée entre les taux de séroconversion des patients devenus colonisés ou infectés au cours de l'étude et le profil PFGE de la souche isolée.

Tableau 11. Taux de séroconversion en fonction du pulsovar chez les patients qui sont devenus colonisés ou infectés pendant l'étude

Pulsovars	rTcdA	rTcdB	rTcdA et rTcdB
A (n=86)	7/80 (8,8)	7/64 (10,9)	4/58 (6,9)
Autres (n=112)	6/100 (6,0)	8/80 (10,0)	1/68 (1,5)
Total (n=198)	13/180 (7,2)	15/144 (10,4)	5/126 (4,0)

Nombre de séroconversions sur total des séronégatifs (%); aucune différence significative entre les séroconversions selon les pulsovars des souches

Nous avons ensuite vérifié si la survenue de séroconversions était associée à une plus grande production de toxines *in vitro* par les souches isolées chez les patients qui sont devenus colonisés ou infectés au cours de l'étude. Les résultats détaillés se trouvent dans le Tableau 12. On trouve une association significative entre un titre de cytotoxine⁶ de 1:10 000 ou plus et la double séroconversion pour rTcdA et rTcdB (Fisher $p<0,05$). Cependant, on ne note pas de différence significative entre les taux de séroconversion des patients porteurs d'une souche ne produisant pas de toxines et des

⁶ Le titre de cytotoxines correspond à la plus grande dilution d'une préparation de toxines qui génère un effet cytotoxique observable sur des cellules en culture

porteurs d'une souche produisant des toxines. Il est toutefois possible que le titre des cytotoxines produites *in vitro* ne soit pas représentatif des taux de production *in vivo*.

Tableau 12. Taux de séroconversion en fonction du titre de cytotoxines chez les patients qui sont devenus colonisés ou infectés pendant l'étude

Titre de cytotoxines	rTcdA	rTcdB	rTcdA et rTcdB
0 (n=47)	3/39 (7,7)	4/39 (10,3)	1/31 (3,2)
1:10 – 1:1000 (n=79)	3/76 (3,9)	4/53 (7,5)	0/50 (0)
1:10 000 – 1:100 000 (n=72)	7/65 (10,8)	7/52 (13,5)	4/45 (8,9) ^A
Total (n=198)	13/180 (7,2)	15/144 (10,4)	5/126 (4,0)

Nombre de séroconversions sur total des séronégatifs (%); ^A: différence statistiquement significative par rapport aux porteurs d'une souche produisant un titre de toxine entre 1:10 - 1:1 000, Fisher $p < 0,05$

3.3.2 Étude B

3.3.2.1 Distribution des patients

Deux-cent-deux (202) patients provenant de deux hôpitaux du Québec ont été enrôlés dans l'étude B. Cent-onze (111) patients proviennent de l'hôpital A et 91 patients de l'hôpital B. Seize (16) patients ne correspondent pas aux critères d'inclusion ou ont quitté volontairement l'étude. Les sérums prélevés chez 3 des patients ont été perdus et certaines informations nécessaires aux analyses ne sont pas disponibles pour 2 des patients. Au total, 181 patients consentants répondent aux critères d'inclusion de l'étude et le sérum prélevé à leur admission dans l'étude (jour 1) est disponible pour les analyses. Un deuxième sérum, prélevé environ 20 jours après l'admission dans l'étude (jour 21), est disponible pour 121 de ces patients.

Les patients enrôlés dans l'étude sont séparés en trois groupes selon l'historique de leurs épisodes de diarrhée à *C. difficile* (DACD). Ils appartiennent au groupe I s'ils souffrent d'un premier épisode connu de DACD, au groupe II si l'épisode présent est une rechute et que le dernier épisode remonte à moins de deux mois et au groupe III s'il s'agit d'une rechute et que le dernier épisode remonte à plus de deux mois. La distribution des patients dans chacun des groupes et dont les sérums sont disponibles au jour 1 et au jour 21 sont présentés dans le Tableau 13. On y distingue également les patients pour lesquels une souche a été isolée (souche) de tous les patients enrôlés dans l'étude (total).

Tableau 13. Distribution des patients de l'étude B aux jours 1 et 21 selon les sérums disponibles et la présence ou non d'une souche de *C. difficile*

Groupe ¹	Jour 1		Jour 21	
	Total ²	Souche	Total	Souche
I	152	120	99	71
II	17	17	12	12
III	12	12	10	10
Total	181	149	121	93

Nombre de sérums disponibles pour l'analyse; ¹: groupe I : première DACD connue, II : rechute < 2 mois, III : rechute > 2 mois; ²: somme des patients chez qui une souche a été isolée et des patients chez qui aucune souche n'a pu être isolée

La survenue d'épisodes de rechute suite à l'entrée dans l'étude a été surveillée durant une période de 90 jours. Le Tableau 14 présente la distribution des rechutes dans chacun des groupes pour tous les patients porteurs de *C. difficile* ayant un sérum disponible pour l'analyse.

Tableau 14. Distribution des patients de l'étude B aux jours 1 et 21 selon les sérums disponibles et la survenue ou non d'épisode(s) de rechute

Groupe	Jour 1 (n=149)			Jour 21 (n=93)		
	Aucune rechute	Rechutes	ND ¹	Aucune rechute	Rechutes	ND
I	73	37	10	40	27	4
II	13	4	-	9	3	-
III	5	7	-	5	5	-

Nombre de patients porteurs d'une souche; ¹ : information non disponible parce que le patient est décédé avant la survenue de rechutes

L'association entre la production d'anticorps et la survenue de complications reliées à une DACD peut être analysée pour les patients de cette cohorte. Le mégacôlon toxique, le choc septique à *C. difficile*, la perforation de la paroi du côlon ou encore le recours à la colectomie témoignent du développement d'une forme sévère de la maladie. Les patients qui sont décédés dans les 30 jours suivant l'épisode de DACD sont également associés au groupe ayant fait une infection compliquée mais on ignore si le décès est directement relié à la DACD. Chez les patients sans épisode précédent connu de DACD (groupe I, n=120), seulement 16 ont développé des complications ou sont décédés dans les 30 jours suivant l'enrôlement dans l'étude. Parmi les 104 patients avec une infection non-compiquée, 68 individus n'ont pas fait de rechute suite au traitement. Enfin, 36 patients avec une infection non-compiquée ont fait au moins une rechute.

3.3.2.2 Résultats de l'ELISA

Les résultats des tests sérologiques détectant les anticorps dirigés contre rTcdA et B, TcdA et B, iTcdA et B et les préparations de flagellines Cd et M pour chacun des groupes de patients aux jours 1 et 21 sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15. Distribution des séropositifs chez les patients porteurs d'une souche

Antigène	Groupe I		Groupe II		Groupe III	
	Jour 1 (n=120)	Jour 21 (n=71)	Jour 1 (n=17)	Jour 21 (n=12)	Jour 1 (n=12)	Jour 21 (n=10)
rTcdA	16 (13,3)	12 (16,9)	2 (11,8)	2 (16,7)	2 (16,7)	2 (20,0)
rTcdB	41 (34,2)	32 (45,1)	6 (35,3)	7 (58,3)	8 (66,7) ^A	9 (90,0) ^B
TcdA	22 (18,3)	12 (16,9)	3 (17,6)	3 (25,0)	2 (16,7)	3 (30,0)
TcdB	19 (15,8)	23 (32,4)	4 (23,5)	5 (41,7)	3 (25,0)	4 (40,0)
iTcdA	6 (5,0)	8 (11,3)	3 (17,6)	2 (16,7)	1 (8,3)	1 (10,0)
iTcdB	17 (14,2)	21 (29,6)	3 (17,6)	3 (25,0)	3 (25,0)	4 (40,0)
Flagellines Cd	34 (28,3)	19 (26,8)	6 (35,3)	7 (58,3) ^B	4 (33,3)	3 (30,0)
Flagellines M	61 (50,8)	41 (57,7)	10 (58,8)	10 (83,3)	5 (41,7)	5 (50,0)

Nombre de patients séropositifs (%); ^A: différence statistiquement significative par rapport au groupe I (jour 1), Fisher p=0,03; ^B: différences statistiquement significatives par rapport au groupe I (jour 21), Fisher p<0,05

Lorsqu'on compare les résultats des analyses sérologiques au jour 1 chez l'ensemble des patients de l'étude, on remarque que les taux de positivité pour tous les anticorps sont similaires entre les patients dont c'est le premier épisode de DACD (groupe I) et les patients qui ont fait un épisode de DACD moins de 2 mois avant leur entrée dans l'étude (groupe II). Il y a toutefois plus de patients séropositifs pour l'anticorps dirigé contre rTcdB chez les patients qui ont fait un épisode de DACD plus de 2 mois avant leur entrée dans l'étude (groupe III) que chez les patients dont c'est le premier épisode de DACD (Fisher p=0,03). Cette différence est également observée au jour 21 (Fisher p=0,01). Au jour 21, les patients du groupe II ont des taux de séropositivité plus élevés que les patients du groupe I pour la présence d'anticorps dirigés contre la préparation de flagellines Cd (Fisher p=0,04). Les autres différences observées entre les groupes ne sont pas significatives.

Selon notre hypothèse initiale, les anticorps dirigés contre *C. difficile* devraient être associés à une protection contre les complications et le décès associés à l'infection. Ainsi, nous avons regroupé les patients selon le développement d'une forme sévère de la maladie ou le décès à 30 jours et l'absence de complications. Les résultats des tests effectués sur les sérums prélevés au jour 1 des patients du groupe I sont présentés dans le Tableau 16. Ce groupe est approprié pour l'analyse de la survenue de complications puisqu'il s'agit d'un premier épisode d'infection pour tous les patients. Cette analyse n'a pas été réalisée avec les résultats du jour 21 car seulement 4 des 16 patients ayant subi des complications ont un deuxième prélèvement de sérum.

Tableau 16. Distribution des séropositifs au jour 1 chez les patients du groupe I selon la survenue ou non de complications

Antigènes	Sans complications (n=104)	Complications¹ (n=16)
rTcdA	13 (12,5)	3 (18,8)
rTcdB	35 (33,7)	6 (37,5)
TcdA	20 (19,2)	2 (12,5)
TcdB	19 (18,3) ^A	0 (0)
iTcdA	6 (5,8)	0 (0)
iTcdB	17 (16,3)	0 (0)
Flagellines Cd	32 (30,8)	2 (12,5)
Flagellines M	57 (54,8) ^B	4 (25,0)

Nombre de patients séropositifs (%); ¹ : infection sévère ou décès à 30 jours; différences significatives par rapport au groupe avec complications, ^A : Fisher p=0,07 (tendance), ^B : p=0,03

Les patients ayant eu une infection à *C. difficile* non-complicquée ont des taux de positivité au jour 1 similaires à ceux des patients qui ont subi des complications ou qui

sont décédés dans les 30 jours suivant l'enrôlement dans l'étude. Les patients avec une infection non-complicquée ont des taux de positivité plus élevés pour les anticorps dirigés contre les flagellines M que les patients qui ont présenté des complications ($p=0,03$). De plus, on remarque que les patients avec une infection non-complicquée *tendent* à avoir des taux de séropositivité pour les anticorps dirigés contre TcdB plus élevés que les patients avec une infection complicquée (Fisher $p=0,07$).

Nous avons par la suite voulu déterminer si la présence d'anticorps spécifiques contre certains antigènes de *C. difficile* protégeait les patients contre les rechutes de l'infection. Le Tableau 17 présente les résultats des tests sérologiques des patients des trois groupes au jour 21 selon la survenue d'un épisode de rechute. Les groupes I, II et III ont été regroupés pour cette analyse puisque nous avons jugé qu'il n'était pas nécessaire de prendre en considération la survenue d'épisodes de DACD avant l'étude.

Tableau 17. Distribution des séropositifs au jour 21 chez les patients porteurs d'une souche selon la survenue ou non de rechutes*

Antigènes	Aucune rechute (n=54)	Rechute(s) (n=35)
rTcdA	11 (20,4)	3 (8,6)
rTcdB	27 (50,0)	19 (54,3)
TcdA	12 (22,2)	5 (14,3)
TcdB	23 (42,6) ^A	8 (22,9)
iTcdA	7 (13,0)	4 (11,4)
iTcdB	20 (37,0)	7 (20,0)
Flagellines Cd	17 (31,5)	11 (31,4)
Flagellines M	33 (61,1)	21 (60,0)

Nombre de patients séropositifs (%); ^A: tendance à une différence par rapport au groupe avec rechute(s), $p=0,06$; * Quatre patients décédés avant la survenue de rechutes ont été exclus

Les patients qui n'ont pas fait de rechute durant la période de l'étude ont des taux de positivité au jour 21 similaires à ceux des patients qui ont fait au moins une rechute. On remarque que les patients qui ne font pas de rechutes *tendent* à avoir des taux de séropositivité plus élevés pour la présence d'anticorps contre TcdB que les patients qui ont fait une ou plusieurs rechutes ($p=0,06$).

Les taux de séroconversion pour chacun des antigènes ont été compilés chez tous les patients. Nous avons comparé les patients qui ont enrayé leur infection sans faire de rechute aux patients qui ont eu des complications (symptômes sévères ou décès) et/ou des rechutes afin de déterminer si la production d'anticorps sériques est impliquée dans la guérison du patient et dans la protection contre les rechutes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18. Taux de séroconversion des patients selon la survenue ou non de complications et/ou de rechutes

Séroconversions	Guérison sans rechute	Complications ¹ /rechutes
rTcdA	2/41 (4,9)	0/35 (0)
rTcdB	12/38 (31,6)	5/23 (21,7)
TcdA	4/42 (9,5)	4/38 (10,5)
TcdB	12/41 (29,3) ^A	4/34 (11,8)
iTcdA	4/49 (8,2)	2/38 (5,3)
iTcdB	8/41 (19,5)	3/34 (8,8)
Flagellines Cd	6/37 (16,2)	3/26 (11,5)
Flagellines M	6/23 (26,1)	2/17 (11,8)

Taux de séroconversion (%); ¹ : infection sévère ou décès à 30 jours; ^A : $p=0,07$ (tendance)

Même si les patients qui ont guéri sans faire de rechutes ont des taux de séroconversion plus élevés pour tous les antigènes – sauf TcdA – que les patients ayant eu une infection sévère, des rechutes ou étant décédés, les différences observées ne sont pas statistiquement significatives. On observe toutefois une *tendance* ($p=0,07$) indiquant que le groupe de patients qui guérissent sans faire de rechute semble avoir un taux de séroconversion pour l'antigène TcdB plus élevé que celui observé chez le groupe de patients qui ont eu des complications de l'infection ou qui ont fait au moins un épisode de rechute.

4. DISCUSSION

4.1 Rappel des objectifs du projet

Depuis plusieurs années, l'épidémiologie changeante de la maladie à *Clostridium difficile* ainsi que l'émergence de clones hypervirulents de la bactérie représentent une menace sérieuse partout à travers le monde. Lors du deuxième symposium international sur *C. difficile*, tenu en 2007 à Maribor, en Slovénie, plusieurs priorités de recherche concernant le pathogène ont été discutées (POXTON, 2008). Parmi les thématiques mises de l'avant se trouvent la compréhension des mécanismes de la pathogenèse de la maladie et l'identification des variables influençant la susceptibilité de l'hôte. L'étude des nouvelles populations à risque d'infection par la bactérie de même que la prévention et le traitement de la maladie font également partie des axes de recherche prioritaires.

Les infections à *C. difficile* engendrent une vaste gamme de symptômes et de présentations cliniques qui vont de la colonisation asymptomatique au mégacôlon toxique et à la mort en passant par la diarrhée modérée et la colite pseudomembraneuse. Certains patients se remettent très bien d'une infection alors que d'autres multiplient les rechutes et les réinfections. Ces différences importantes dans les conséquences de la rencontre du pathogène avec un hôte sont encore mal expliquées. Nous avons donc voulu évaluer l'importance du rôle de la réponse humorale dans la protection contre la colonisation par la bactérie, le développement des symptômes et la survenue d'épisodes de rechutes. Pour ce faire, nous avons développé et mis au point un test ELISA pour détecter les anticorps dirigés contre *C. difficile* dans des sérums humains. En théorie, les anticorps que nous avons recherchés ont un potentiel neutralisant contre des facteurs de virulence de la bactérie. Afin de déterminer si la

présence de ces anticorps est effectivement associée à une protection contre le pathogène *in vivo*, nous avons corrélé les résultats des analyses sérologiques de chacun des patients de l'étude avec leur statut clinique (historique des DACD, complications des symptômes, épisode(s) de rechute).

4.2 Choix et préparation des antigènes de capture

Le premier volet du projet consistait à choisir et à préparer les antigènes utilisés pour la capture des anticorps dans le test ELISA. Ces protéines devaient posséder les caractéristiques suivantes : 1) être antigéniques; 2) être impliquées dans la virulence de la bactérie; 3) être disponibles en quantité suffisante pour leur utilisation dans un test ELISA réalisé sur un très grand nombre de spécimens. Nous avons donc sélectionné les toxines A et B, les principaux facteurs de virulence de la bactérie, la composante d'attachement (b) de la toxine binaire CDT, un antigène encore très peu étudié, ainsi que la protéine de flagelle FliD, une adhésine servant à l'implantation de la bactérie au tube digestif (TASTEYRE *et al.*, 2001b).

La purification des toxines A et B à partir de surnageants de culture s'est avérée décevante. D'abord, il aurait fallu augmenter le volume initial de culture de *C. difficile* en milieu thioglycollate afin de s'assurer la production d'une plus grande quantité de toxines. Par ailleurs, plutôt que d'utiliser de la thyroglobuline bovine lors de la première étape de purification des toxines, c'est de la thyroglobuline porcine qui a été utilisée par erreur. Cela explique en partie le faible rendement de la purification puisqu'il est rapporté que l'affinité de la thyroglobuline porcine pour la toxine A est inférieure à celle de la thyroglobuline bovine (KRIVAN et WILKINS, 1987). En troisième lieu, la concentration protéique initiale du milieu thioglycollate dans lequel les toxines ont été produites était

très élevée. Il est probable que ces protéines aient obstrué les résines utilisées lors des purifications sur colonnes d'affinité, entraînant ainsi une faible récupération des toxines. Ce sont ces constats qui ont motivé la recherche des conditions optimales de production des toxines dans un tampon ne contenant pas de protéines. Bien que des conditions permettant de produire un extrait de toxines concentré aient été identifiées (voir section 3.1.2), le volume de culture requis pour produire assez de toxines pour réaliser l'ensemble des tests de l'étude aurait nécessité l'utilisation d'enceintes de biosécurité et de fermenteurs. Les travaux sur la purification des toxines ont été arrêtés puisque six différentes préparations de toxines purifiées nous ont été offertes pour tester les sérums : les toxines recombinantes A et B clonées chez *E. coli*, les toxines A et B natives ainsi que les toxines A et B inactivées (toxoides) purifiées à partir de cultures de *C. difficile*.

Nous étions également intéressés par l'étude de la réponse humorale systémique des patients contre la troisième toxine produite par *C. difficile*, la toxine binaire CDT. La toxine binaire de *C. difficile* est formée de deux protéines distinctes, CDTa et CDTb. CDTa possède une activité enzymatique et CDTb est responsable de l'internalisation de l'enzyme dans la cellule-cible via la liaison à un récepteur spécifique (PERELLE *et al.*, 2004). Le rôle de cette toxine dans la virulence de la bactérie n'est pas encore bien établi. Nous avons posé l'hypothèse qu'un anticorps bloquant le site de liaison de la toxine à son récepteur pourrait neutraliser l'effet de la toxine sur les cellules. La comparaison entre la présentation clinique de la maladie à *C. difficile* des patients ayant produit ces anticorps et des patients séronégatifs pour ces anticorps pourrait fournir des informations importantes quant au rôle de la toxine binaire lors de l'infection par la bactérie.

Un volet du projet portait donc sur le clonage en trois portions du gène *cdtB* et son expression dans *E. coli*. Nous avons construit quatre clones : chacun d'entre eux a été transformé avec un plasmide portant une portion du gène *cdtB* couplé à une étiquette histidine (6X-His) pour en faciliter la purification. L'induction avec l'IPTG ainsi que la purification des protéines recombinantes à partir du surnageant de culture (selon les protocoles fournis par le fabricant) n'ont pas permis de récolter de protéines couplées à une étiquette histidine. L'induction du contrôle d'induction a pourtant permis l'expression d'une protéine couplée à une étiquette His. Puisque nos protéines recombinantes ne semblaient pas avoir été excrétées dans le milieu de culture, elles ont également été cherchées dans l'espace périplasmique ainsi que dans la fraction de protéines insolubles. Les résultats négatifs obtenus portent à croire que certains paramètres du clonage (choix des vecteurs et des cellules d'expression, par exemple) devront être optimisés avant de poursuivre avec un protocole pour l'expression et la purification des protéines recombinantes. Par ailleurs, le fait que *C. difficile* possède un génome pauvre en guanines (G) et cytosines (C) est un facteur qui a pu nuire à la synthèse de ses protéines chez *E. coli*. La bactérie d'expression présentait peut-être un déficit au niveau des ARNs de transfert spécifiques à certains codons présents sur la séquence clonée. Lorsqu'on analyse le gène *cdtB*, on remarque que plus de 10% de sa séquence est constituée de codons très peu utilisés par *E. coli*! La présence de codons rares dans une séquence clonée chez *E. coli* peut significativement diminuer les niveaux d'expression de la protéine d'intérêt. Il est aussi possible que les protéines clonées aient des séquences incompatibles avec *E. coli* ou qu'elles soient dégradées rapidement. Bien qu'elle présente quelques différences avec la séquence d'origine, la séquence nucléotidique des gènes clonés comprise entre le codon de départ (sur le gène cloné) et le codon d'arrêt (sur le vecteur) ne contient pas de mutations qui pourraient entraîner une troncature dans la protéine. On a observé que certains changements au niveau de

la séquence en acides aminés sont présents chez un seul clone. Ils ont probablement été générés par la souche servant à la réplication du plasmide puisqu'ils ne se retrouvent pas sur la séquence de l'insert préparé par PCR. Toutefois, 3 différences par rapport à la séquence publiée sont présentes dans les inserts et chez tous les clones (K598Q, I720M et E827Q). Ces changements doivent être mentionnés puisque, par exemple, la substitution de l'acide glutamique en position 827 pour la glutamine peut potentiellement générer des changements au niveau du repliement (structure tridimensionnelle), de la fonction et/ou de l'antigénicité de la protéine CdtB produite par cette souche de *C. difficile* car ce sont deux acides aminés portant une charge opposée.

Un clone de *E. coli* exprimant une protéine FliD recombinante couplée à une étiquette GST (TASTEYRE *et al.*, 2001a) nous a également été fourni dans le cadre de ce projet. Cette protéine est antigénique (PÉCHINÉ *et al.*, 2005a) et l'administration par voie rectale d'une préparation de FliD et de d'autres protéines de surface diminuent les taux de colonisation intestinale par *C. difficile* chez le hamster (PÉCHINÉ *et al.*, 2007). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a encore démontré que les anticorps sériques naturels dirigés contre FliD protègent l'humain de la colonisation par la bactérie. Nous avons adapté le protocole de production et de purification de la protéine pour obtenir un extrait concentré de FliD. Suite au passage sur une résine Glutathione Sepharose, la protéine était suffisamment pure pour être utilisée dans le test ELISA. Cependant, tout comme lors de la purification des toxines natives, le volume de culture nécessaire à la production d'une quantité suffisante de protéine FliD pour réaliser toutes les analyses sérologiques était trop important. Des préparations de flagelles provenant de deux souches de *C. difficile* nous ont finalement été fournies.

4.3 Mise au point et validation du test ELISA

Dans un premier temps, un groupe de sérums de référence (108 échantillons provenant de l'étude A) a été élaboré à l'aide du test de neutralisation de la cytotoxicité. Nous avons utilisé un surnageant de culture d'une souche de *C. difficile* produisant les toxines A et B que nous avons incubé avec les sérums avant de le déposer sur des cellules de la lignée MRC-5 en culture. Chacun des paramètres de l'ELISA a ensuite été ajusté avec les sérums de référence afin que les résultats obtenus corrélaient avec le test de neutralisation. Le test ELISA a été élaboré de manière à séparer le plus nettement possible les sérums positifs des sérums négatifs. Lors de l'ajustement des paramètres, nous avons constaté que l'ELISA ne nous permettait pas de faire la distinction entre les sérums intermédiaires et les sérums fortement positifs selon le test de neutralisation. Les résultats du test sérologique ont par conséquent été reportés sur une échelle nominale dichotomique (résultat positif ou négatif).

Les antigènes de capture rTcdA et rTcdB ont été utilisés pour vérifier la sensibilité et la spécificité de l'ELISA car ce sont les seuls antigènes qui étaient disponibles lors de la mise au point du test. La sensibilité et la spécificité du test ELISA pour la détection des anticorps contre rTcdA sont de 85,7% et de 80,9%, respectivement. L'ELISA détectant les anticorps dirigés contre rTcdB a une sensibilité de 100% et sa spécificité est de 92,9%. Il est possible que de faibles différences significatives entre les groupes pour la présence d'anticorps contre les antigènes de la toxine A n'aient pas pu être mises en évidence à cause de la sensibilité et de la spécificité moins élevées de ces tests. Au moment de la mise au point, nous avons également confirmé que le protocole présentait une bonne reproductibilité intra- et inter-plaques.

Puisque la toxine B est une cytotoxine 1000 fois plus puissante que la toxine A (DU et ALFA, 2004), les résultats du test de neutralisation attestent du potentiel d'un sérum à neutraliser la toxine B de *C. difficile*. Les tests ELISA les mieux ajustés sont donc ceux ayant servi à la détection des anticorps dirigés contre la toxine B (rTcdB, TcdB et iTcdB). Comme nous ne disposions pas de tests de référence pour confirmer la présence des anticorps sériques dirigés contre la toxine A ou contre les antigènes du flagelle, les paramètres utilisés pour détecter les anticorps contre la toxine B ont été appliqués aux tests servant à détecter les anticorps contre la toxine A (rTcdA, TcdA et iTcdA) et contre les flagellines (Cd et M). Les concentrations de chacun des antigènes de capture ont cependant été ajustées individuellement pour pouvoir distinguer les sérums positifs des sérums négatifs. L'utilisation d'une méthode uniforme pour tous les tests a contribué à faciliter les manipulations et à diminuer les risques d'erreur lors de l'application du protocole.

Après avoir réalisé les analyses sérologiques sur tous les échantillons de l'étude, nous avons vérifié que la sensibilité et la spécificité des tests ELISA étaient toujours bonnes. La sensibilité des tests utilisant comme antigène de capture la toxine B (rTcdB, TcdB et iTcdB) est supérieure à 95%. La spécificité du test détectant les anticorps dirigés contre rTcdB est de 60,4% et celles des tests utilisant TcdB et iTcdB sont supérieures à 75% (respectivement 77,3% et 80,4%). Ces données indiquent qu'un plus grand nombre de patients séropositifs sont détectés par le test ELISA que par le test de neutralisation. Le groupe de Viscidi (VISCIDI *et al.*, 1983) a obtenu des résultats semblables lorsqu'il comparait les résultats de la neutralisation avec l'ELISA. Cette diminution de la spécificité des tests par rapport aux valeurs obtenues lors de l'ajustement peut être expliquée par l'augmentation de la taille de l'échantillon lors de la validation post-expérimentale. De plus, il est possible que l'ELISA détecte la présence

d'anticorps qui ne sont pas neutralisants ou que des anticorps non-spécifiques réagissent de façon croisée avec les antigènes de capture. Par ailleurs, le test ELISA tel que nous l'avons mis au point semble plus sensible que le test de neutralisation standard. Nous avons vérifié si l'utilisation de sérums plus concentrés dans le test de neutralisation (dilution de 1:2 plutôt que 1:10) permettait d'augmenter les corrélations entre l'ELISA et la neutralisation. Un plus grand nombre de sérums positifs au test ELISA sont également positifs au test de neutralisation quand on utilise un sérum dilué 1:2 (rTcdB : 30,8%, TcdB : 43,8%, iTcdB : 50,6%) que lorsqu'on dilue le sérum 1:10 (rTcdB : 19,3%, TcdB : 29,9%, iTcdB : 33,1%). Les sérums négatifs au test ELISA demeurent négatifs au test de neutralisation même lorsqu'on utilise un sérum plus concentré (rTcdB : 0,7% pour une dilution 1:10 vs 3,8% pour une dilution 1:2, TcdB : 0,3% vs 1,1%, iTcdB : 0,3% vs 0,0%). Ces données semblent confirmer que le test de neutralisation avec une dilution de 1:10 est moins sensible que notre test ELISA.

Le test ELISA que nous avons développé dans le cadre de ce projet se compare avantageusement aux autres tests servant à détecter des anticorps dirigés contre *C. difficile* décrits dans la littérature. Une méthode citée fréquemment est celle de Warny *et al.* (WARNY *et al.*, 1994). Pour déterminer la valeur-seuil de positivité des sérums d'une même plaque, ils multiplient par cinq le résultat obtenu dans un puits sans sérum (bruit de fond de la plaque). Nous avons plutôt voulu nous assurer d'avoir une bonne corrélation avec le test de neutralisation de la cytotoxicité et nous avons utilisé une méthode statistique pour déterminer la valeur-seuil de positivité avec un niveau de confiance $1-\alpha$ de 95%. Notre méthode semble aussi sensible par rapport au test de neutralisation que celle du groupe de Warny (valeurs supérieures à 95%) mais sa spécificité est plus grande. En calculant la valeur-seuil selon leurs indications, nos tests présentent une spécificité inférieure à 15% pour rTcdB et inférieure à 50% pour TcdB et

iTcdB alors que notre méthode nous permet d'obtenir une spécificité de plus de 60% pour rTcdB et de plus de 75% pour TcdB et iTcdB.

4.4 Modèles proposés de la réponse humorale contre *C. difficile*

4.4.1 Étude A

Les résultats de l'étude A ont permis de confirmer l'antigénicité des toxines A et B de *C. difficile* ainsi que leur potentiel à stimuler de façon naturelle la branche humorale du système immunitaire. En effet, 34,8% des patients de cette population sont séropositifs pour les anticorps dirigés contre la portion C-terminale recombinante de la toxine A et/ou de la toxine B. Dans ce sens, d'autres études, dont une très récente, estiment la séroprévalence des anticorps contre *C. difficile* dans la population générale inférieure à 30% (BACON et FEKETTY, 1994, FENGER *et al.*, 2009). Ces résultats diffèrent toutefois des données de prévalence mesurées par le passé et citées abondamment dans la littérature. Ainsi, Viscidi *et al.* (VISCIDI *et al.*, 1983) rapportent une séroprévalence de 82% pour les anticorps dirigés contre les toxines A et/ou B dans un groupe de 340 individus âgés de 0 à 79 ans. Chez les 165 adultes sains servant de contrôles dans l'étude de Warny *et al.* (WARNY *et al.*, 1994), la prévalence des anticorps dirigés contre la toxine A est de 72%. Notre étude est, à notre connaissance, la seule ayant été réalisée sur un aussi grand nombre de spécimens. Contrairement à beaucoup d'autres travaux, aucune sélection basée sur la présence de la maladie à *C. difficile* n'a été effectuée. De plus, tel que discuté dans la section 4.3, les paramètres de notre test ELISA de même que la valeur-seuil de positivité ont été rigoureusement choisis afin de pouvoir corrélérer les résultats avec le test de neutralisation de la cytotoxicité. En utilisant les mêmes critères pour le calcul de la valeur-seuil de positivité que les études

présentées ci-haut, nous obtenons des taux de prévalence similaires à ceux des autres études (environ 60% de séropositivité pour la toxine B native purifiée) (KELLY, 1996). La spécificité des tests par rapport au test de neutralisation est cependant significativement diminuée. Cela signifie qu'une forte proportion de sérums ayant un résultat positif au test ELISA dans les autres études ne présente probablement pas d'activité neutralisante.

En plus d'évaluer la prévalence des anticorps contre les toxines dans la population générale, un des objectifs du projet était de déterminer si les anticorps sériques contre *C. difficile* détectés au moment de l'admission à l'hôpital protègent le patient contre la survenue d'une colonisation ou d'une infection nosocomiales. Cependant, cette question n'a pas pu être analysée adéquatement avec ce groupe de patients puisque la survenue d'épisodes antérieurs d'infections à *C. difficile* n'a pas été documentée. Il a donc été impossible de séparer les patients ayant fait plusieurs rechutes par le passé de ceux étant en contact avec la bactérie pour la première fois. De plus, plusieurs données ayant été recueillies dans le cadre du projet ne nous étaient pas accessibles. Par exemple, des informations sur les patients concernant l'âge, le sexe, la présence de comorbidités, la prise d'antibiotiques ou de médicaments immunodépresseurs n'ont pas pu être considérées lors de nos analyses. Ces données seront disponibles plus tard et serviront dans le cadre d'une analyse multivariée. Des précisions et des conclusions supplémentaires en seront probablement tirées et apporteront certainement une plus grande significativité à cette étude.

Plusieurs hypothèses peuvent toutefois être émises en fonction des données dont on dispose. Ainsi, on peut d'abord observer que la présence d'anticorps sériques contre les toxines A et B lors de l'admission d'un patient à l'hôpital ne semble pas influencer la survenue d'une colonisation ou d'une infection nosocomiale par *C. difficile*.

En effet, les patients qui sont demeurés sains pour *C. difficile* ne possédaient pas plus d'anticorps contre les toxines de la bactérie lors de leur entrée à l'hôpital que les patients qui sont devenus colonisés ou infectés. Ainsi, la détection des anticorps sériques contre les toxines de *C. difficile* chez les individus nouvellement hospitalisés ne pourrait pas servir à dépister les patients étant plus à risque d'être colonisés ou infectés par la bactérie. De même, la détection des anticorps contre *C. difficile* chez les patients qui se présentent à l'hôpital avec une diarrhée ne serait pas utile pour déterminer si les symptômes sont attribuables ou non à la bactérie. Il est possible que la présence d'une réponse immunitaire contre des antigènes différents ou que la production de d'autres anticorps que les anticorps sériques, des immunoglobulines A sécrétoires (S-IgA) de la muqueuse intestinale, par exemple, corrèle mieux avec la protection contre l'infection à *C. difficile*. Il serait toutefois ardu d'élaborer un test de dépistage des S-IgA dans les selles ou dans les prélèvements muqueux qui soit adapté aux contraintes du milieu hospitalier (complexité de l'échantillonnage, temps technique pour la réalisation du test, etc.)

Au moment de l'admission dans l'étude, les patients qui sont devenus colonisés durant leur séjour à l'hôpital ont un taux de séropositivité plus élevé pour la présence d'anticorps contre la toxine B que les patients qui sont demeurés sains. Tel qu'attendu, les anticorps dirigés contre la toxine B ne protègent pas contre la colonisation par *C. difficile* (KYNE *et al.*, 2001). Ces anticorps pourraient cependant neutraliser l'effet des toxines et prévenir le développement des symptômes de l'infection et ainsi être retrouvés plus souvent chez les patients colonisés. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par les résultats de cette étude puisque les taux de séropositivité à l'admission des patients colonisés et des patients infectés ne présentent pas de différences significatives.

L'interprétation des résultats est compliquée par les faibles taux de prévalence de la colonisation et de l'infection par *C. difficile* dans la population de cette étude : 3,9% des patients étaient colonisés au moment de l'admission dans l'étude, 4,5% des patients sont devenus colonisés lors de l'hospitalisation, 1,3% étaient infectés au moment de l'admission dans l'étude et 2,0% ont eu une infection nosocomiale (Figure 18). Certains groupes sont très petits et il devient alors difficile d'avoir suffisamment de puissance statistique pour détecter des différences significatives.

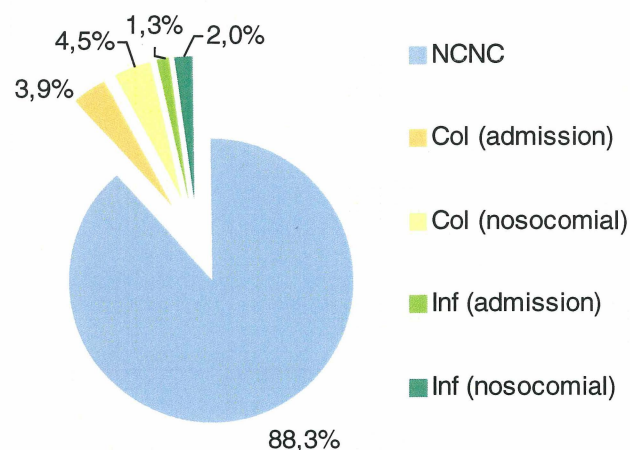


Figure 18. Taux de prévalence des colonisations et des infections dans l'étude A

Col : Colonisé, Inf : Infecté

Nous avons constaté qu'une proportion plus importante de patients qui sont déjà colonisés que de patients sains possède des anticorps contre la toxine B au moment de l'admission. La présence d'anticorps sériques spécifiques chez les patients ayant été en contact avec *C. difficile* et ses toxines témoigne d'abord de leur exposition aux antigènes de la bactérie. Il semble ensuite probable que cette réponse ait pu empêcher les patients colonisés de devenir des cas en neutralisant l'activité des toxines. À l'inverse, il se peut qu'un patient infecté par le passé ait produit suffisamment d'anticorps pour enrayer les symptômes de la maladie mais qu'il soit demeuré colonisé par la bactérie.

Les patients qui ont contracté la bactérie durant l'étude (présence ou non de symptômes) ont eu des taux de séroconversion pour la présence d'anticorps dirigés contre la toxine A et/ou la toxine B significativement plus élevés que les patients qui sont demeurés sains. De plus, les patients qui ont développé une DACD ont fait plus de séroconversions pour la toxine A et la toxine B séparément que ceux qui étaient déjà colonisés et plus de séroconversions pour la toxine B que les patients infectés au moment de l'admission. Il semble donc que les patients qui sont contaminés par *C. difficile* développent des anticorps dirigés contre la portion C-terminale des toxines A et B de la bactérie. Le devis de cette étude ne permet pas de déterminer si les patients qui ont produit des anticorps sériques contre l'une ou l'autre des toxines ont enrayé leurs symptômes plus rapidement que les patients qui n'ont pas développé de réponse humorale ou encore si leur taux de rechutes était plus faible. De plus, l'échantillonnage des sérums de cette étude n'est pas particulièrement bien adapté à la détection des séroconversions. En effet, certains patients ont eu un deuxième prélèvement de sérum seulement quelques jours après le premier prélèvement puisqu'ils obtenaient leur congé de l'hôpital, par exemple. Il est possible que ce délai se soit avéré trop court pour qu'on puisse détecter une augmentation des taux d'anticorps sériques. Il aurait fallu espacer les prélèvements d'environ deux semaines pour s'assurer que le système immunitaire ait bénéficié du temps nécessaire pour développer une réponse sérique contre les antigènes utilisés dans notre test ELISA, s'il y avait lieu.

Il peut sembler surprenant que des patients NCNC ou encore des patients porteurs d'une souche non-toxinogène aient pu faire une séroconversion (voir Tableaux 9 et 12). Dans le premier cas, il est possible que la méthode de détection des patients colonisés ou infectés (recherche de la bactérie dans les selles) ait manqué de sensibilité. Des patients porteurs de la bactérie ont donc pu être classifiés par erreur dans la

catégorie NCNC. Par ailleurs, certains patients NCNC ont peut-être été colonisés ou infectés par *C. difficile* seulement quelques jours ou quelques semaines avant leur hospitalisation. La bactérie n'a pas pu être isolée à l'admission dans l'étude mais les patients ont développé une réponse immunitaire qui n'a été décelée qu'au moment du deuxième prélèvement de sérum. Enfin, certains anticorps ont pu réagir de façon non-spécifique au test ELISA et générer des faux-positifs. Cette dernière hypothèse est également valable pour les patients porteurs d'une souche non-toxinogène qui ont fait une séroconversion pour les anticorps dirigés contre les toxines. Il est aussi possible que certain de ces patients aient eu une co-infection avec plusieurs souches de *C. difficile* et que la souche isolée et testée pour la production de cytotoxines n'en sécrétait aucune. Enfin, tel que mentionné précédemment, les taux de toxines mesurés *in vitro* sont peut-être différents des taux de production *in vivo*.

Les spécimens de l'étude A nous ont permis d'étudier la relation entre la production des anticorps sériques contre la portion C-terminale des toxines A et B de *C. difficile* et la survenue de la colonisation ou de l'infection par la bactérie en milieu hospitalier. Nous avons intégré les résultats des sérologies dans un modèle simplifié de la pathogenèse de l'infection à *C. difficile*. Le modèle présenté à la Figure 19 met en perspective nos hypothèses quand au rôle fonctionnel de la réponse humorale dirigée contre des antigènes de *C. difficile* et à sa relation avec les autres facteurs de l'hôte pouvant influencer la colonisation et l'infection.

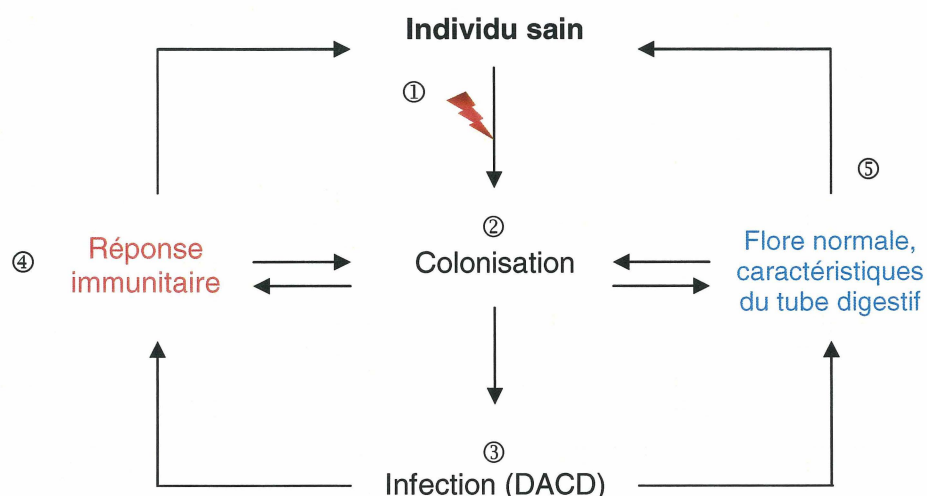


Figure 19. Modèle proposé selon les résultats de l'étude A

Tel que discuté dans l'introduction, les individus sains se contaminent (①) en ingérant les spores de *C. difficile* présentes dans l'environnement. En milieu hospitalier, les taux de contamination des surfaces par les spores de la bactérie sont particulièrement élevés (DUBBERKE *et al.*, 2007, DUMFORD *et al.*, 2009). Des conditions propices à la germination des spores et à l'implantation de *C. difficile* au tube digestif sont ensuite nécessaires pour que la bactérie puisse se multiplier et coloniser son hôte (②). Lorsqu'un individu est colonisé par une souche toxigène, il peut demeurer un porteur asymptomatique ou développer les symptômes de l'infection (③). Les patients infectés peuvent revenir à un état colonisé (détection de la bactérie ou de ses toxines dans les selles en l'absence de symptômes cliniques) ou encore se débarrasser complètement de la bactérie. De même, il est possible que les patients colonisés redeviennent sains pour *C. difficile* (PRIVITERA *et al.*, 1991). Les mécanismes associés à l'éradication de *C. difficile* chez ces derniers relèvent de la réponse de l'hôte puisque le traitement des patients asymptomatiques n'est pas recommandé (JOHNSON *et al.*, 1992a). Dans le cadre de cette étude, nous avons confirmé que la colonisation et

l'infection par *C. difficile* entraînent la production d'anticorps sériques neutralisants (④). Nos résultats laissent toutefois croire que des facteurs de l'hôte supplémentaires (⑤) sont directement impliqués dans la défense contre *C. difficile* et dans l'issue de la colonisation ou de l'infection par la bactérie.

Tout d'abord, avant même d'entraîner le développement d'une réponse immunitaire spécifique, les pathogènes qui se présentent à la muqueuse intestinale rencontrent plusieurs barrières protectrices. L'intégrité de ces barrières varie d'un individu à l'autre et pourrait être déterminante dans l'issue de l'infection. En premier lieu, la flore normale du tube digestif procure à l'hôte une résistance contre la colonisation par les microorganismes pathogènes (DONSKEY, 2004) et est spécifiquement impliquée dans le contrôle de la densité de la population de *C. difficile* au côlon (WILSON, 1993). L'altération de la flore normale par la prise d'antibiotiques génère un environnement favorable à la prolifération de la bactérie (OWENS *et al.*, 2008). Les bénéfices de l'utilisation des probiotiques (SURAWICZ *et al.*, 2000, ISAKOW *et al.*, 2007, CHEN *et al.*, 2006) ou encore des greffes de selles (AAS *et al.*, 2003) dans le traitement des infections à *C. difficile* confirment le rôle protecteur des microorganismes commensaux de la flore intestinale contre la maladie. Plusieurs effecteurs cellulaires (neutrophiles, cellules NK, etc.) jouent aussi un rôle non-négligeable dans la défense immunitaire non-spécifique de la muqueuse contre les pathogènes. Enfin, des « mécanismes de défense non-immunologiques » (RAZAVI *et al.*, 2007) comme le pH des liquides gastriques, l'efficacité du péristaltisme ainsi que la durée du transit intestinal des aliments ingérés pourraient avoir un rôle plus important dans la protection contre la bactérie qu'on ne le pense. Selon Vollaard et Clasener (VOLLARD et CLASENER, 1994), les mécanismes qui antagonisent l'adhérence d'un pathogène et qui favorisent un transit intestinal rapide sont impliqués, avec la flore normale, dans la résistance contre la colonisation.

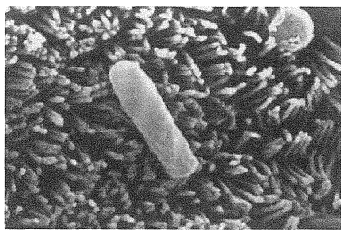


Figure 20. Adhésion de *C. difficile* aux microvillosités

Cellules Caco2 en culture,
Source : ÉVEILLARD *et al.*,
1993

Au niveau de la réponse immunitaire acquise, des anticorps spécifiques à d'autres antigènes de *C. difficile* – des antigènes de surface impliqués dans l'adhésion au tube digestif, par exemple – pourraient protéger plus efficacement le patient que les anticorps dirigés contre les toxines A et B que nous avons détectés dans le cadre de cette étude. La bactérie peut se lier à une variété de lignées cellulaires en culture (Figure 20) et on sait que son adhésion à la muqueuse digestive est préalable à la colonisation et à la production des toxines (CALABI *et al.*, 2002). Des anticorps dirigés spécifiquement contre les adhésines neutraliseraient donc *C. difficile* avant même l'expression de ses facteurs de virulence majeurs. Privé de sa capacité d'adhésion, le pathogène serait excrété en même temps que les déchets de la diète via le transit intestinal naturel. Selon Péchiné *et al.* (PÉCHINÉ *et al.*, 2007), l'inhibition de la colonisation par *C. difficile*, la première étape de la pathogénèse, permettrait également de réduire la dissémination de la bactérie.

De plus, tel qu'abordé à la section 1.6.4, la présence de pathogènes intestinaux induit une réponse humorale localisée (production de S-IgA) qui joue un rôle primordial dans la défense des surfaces muqueuses de l'hôte (FRAGARASAN et HONJO, 2004). À ce jour, les chercheurs ont constaté que des anticorps S-IgA contre *C. difficile* spécifiques à la toxine A étaient produits chez l'humain par la muqueuse intestinale (KELLY *et al.*, 1992, JOHNSON *et al.*, 1992b) mais leur rôle protecteur reste à confirmer.

En terminant, la présentation de la maladie peut également être modulée par les caractéristiques particulières de la souche de *C. difficile* avec laquelle un patient est

infecté. La virulence des différentes souches, leur toxinotype, leur susceptibilité à l'infection par les bactériophages (GOH *et al.*, 2005), l'accroissement de leur capacité de sporulation (ÅKERLUND *et al.*, 2008) ou encore la production d'inhibiteurs des immunoglobulines (NÍ EIDHIN *et al.*, 2008) sont autant de facteurs qui pourraient influencer la capacité d'un patient à se défendre contre l'infection.

4.4.2 Étude B

Le groupe de patients enrôlés dans l'étude B nous a permis d'étudier la réponse immunitaire du patient suite à une infection à *C. difficile*. Ces patients, contrairement aux patients de l'étude A, ont été recrutés sur la base de la présence d'une diarrhée à *C. difficile*. Certains d'entre eux étaient en contact avec la bactérie pour la première fois (groupe I) alors que d'autres subissaient une rechute ou une réinfection (groupes II et III). Nous discuterons dans cette section de la relation entre la présence d'anticorps et le développement de complications ou le décès, la résolution des symptômes ainsi que la survenue de rechutes.

Comme on l'a observé avec les patients de l'étude A, un plus grand nombre de patients de l'étude B sont séropositifs pour les anticorps dirigés contre les antigènes de la toxine B (en moyenne, 23,2% des patients ont au moins des anticorps dirigés contre un des antigènes de la toxine B lors de l'admission dans l'étude) que pour les anticorps dirigés contre les antigènes la toxine A (séroprévalence moyenne de 12,7%). La prévalence plus élevée d'anticorps dirigés contre rTcdB que d'anticorps dirigés contre TcdB et iTcdB (voir Tableau 15) est peut-être expliquée par le fait que la structure tertiaire de la protéine recombinante est différente de celle de la protéine native. Puisqu'il s'agit d'un fragment de protéine cloné, le repliement de rTcdB suite à son expression

chez *E. coli* pourrait permettre la formation d'épitopes conformationnels réagissant de façon non-spécifique avec un plus grand nombre d'anticorps. Enfin, on remarque également que les préparations de flagellines sont fortement antigéniques (séroprévalence moyenne de 40,3%). Ces résultats nous confirment à nouveau que les antigènes de *C. difficile* – toxines ou protéines de surface – entraînent la production d'anticorps sériques chez les patients qui sont en contact avec la bactérie.

Au moment de l'admission dans l'étude, les patients de tous les groupes présentaient entre eux des taux d'anticorps similaires, sauf pour l'antigène rTcdB. En effet, il y avait plus de séropositifs pour les anticorps contre rTcdB dans le groupe de patients ayant eu un ou plusieurs épisodes d'infection à *C. difficile* plus de deux mois avant l'entrée dans l'étude que dans le groupe de patients dont c'est la première infection. Cette différence est également significative au jour 21. Il est probable que les patients produisent des anticorps dirigés contre la portion C-terminale de la toxine B de *C. difficile* dès la première rencontre avec le pathogène mais que la réponse soit intensifiée significativement lors d'une infection subséquente (réponse anamnétique). Comme les patients qui ont fait une infection moins de deux mois avant l'épisode de l'étude n'ont pas des taux de séropositivité plus élevés que les patients dont c'est la première infection, on peut poser l'hypothèse que des facteurs supplémentaires expliquent cette différence de séroprévalence. Par exemple, plusieurs rencontres avec le pathogène sont peut-être nécessaires avant qu'on puisse détecter une réponse. Les informations portant sur le nombre d'infections avant l'étude ne sont malheureusement pas disponibles dans le cadre de cette étude.

Les résultats des tests au jour 21 montrent aussi une proportion plus importante de patients ayant des anticorps contre la préparation de flagellines Cd chez les individus

du groupe qui ont fait une DACD moins de deux mois avant l'étude par rapport aux patients du groupe dont c'est la première infection. Cependant, aucune analyse subséquente ne semble indiquer que ces anticorps modifient le déroulement de la DACD. Il est possible que les anticorps dirigés contre les flagellines Cd confirment qu'une réponse humorale est élaborée contre les antigènes de surface la bactérie mais qu'ils ne possèdent pas de rôle fonctionnel. Contrairement à ce que l'on pourrait s'attendre, les patients du groupe qui ont fait une DACD plus de deux mois avant l'étude ne présentent pas des taux d'anticorps contre l'antigène Cd plus élevés que les patients qui ont fait une DACD plus récemment. On peut tenter d'expliquer cette observation par quelques hypothèses. Il se peut que le groupe III ait été enrichi en patients qui font une récurrence justement parce qu'ils ne parviennent pas à monter une réponse immunitaire efficace (biais de sélection). De plus, ces patients ont peut-être été fortement médicamentés lors de leur hospitalisation, ce qui a eu pour effet de nuire à la production des anticorps. Enfin, les groupes II et III sont de très petite taille, soit 12 et 10 patients. Il est difficile de tirer des conclusions significatives avec un échantillon aussi restreint.

Une question importante abordée dans le cadre de cette étude porte sur le rôle des anticorps sériques dans la protection contre les complications de la DACD. Nous avons donc étudié la relation entre la présence d'anticorps sériques contre les antigènes de la bactérie au jour 1 et la survenue de symptômes sévères ou le décès du patient dans les 30 jours suivant l'infection. Bien que le groupe de patients ayant eu des complications présente des taux d'anticorps sériques contre la toxine B (TcdB) et contre la préparation de flagellines M plus faibles que le groupe contrôle, il est difficile de tirer des conclusions significatives puisque seulement 16 patients parmi la population à l'étude ont eu des complications suite à la DACD. Si un plus grand groupe de patients avec des complications avait pu être échantillonné au jour 21, il aurait été plus approprié

de considérer les résultats de ces prélèvements pour mesurer la corrélation entre la présence d'anticorps et la survenue de complications. De cette façon, tous les patients auraient disposé d'un minimum de 3 semaines pour développer une réponse humorale contre *C. difficile* suite à l'infection. Lors d'une première rencontre avec un antigène, il faut compter de 5 à 7 jours avant d'observer une augmentation des taux anticorps et de 10 à 17 jours pour que cette réponse primaire atteigne son maximum (GOLDSBY *et al.*, 2003). Le devis de l'étude B fait en sorte qu'un patient peut avoir été en contact avec la bactérie longtemps avant son admission dans l'étude alors qu'un autre peut avoir été infecté seulement quelques jours avant son enrôlement et nous ne disposons d'aucune information nous permettant de distinguer ces deux éventualités.

Malgré ces lacunes dans le devis de l'étude, il est tout de même possible de commenter l'association significative entre la protection contre la survenue des complications de la DACD et la présence d'anticorps dirigés contre la préparation de flagellines M. Ces anticorps, lorsque couplés à une antibiothérapie, permettent peut-être d'augmenter la rapidité avec laquelle le patient se débarrasse de son infection et contribuent à éviter que des symptômes sévères aient le temps de se développer. D'une part, les anticorps produits au cours de l'infection pourraient neutraliser les nouvelles bactéries dès leur multiplication (avant qu'elles n'adhèrent au tube digestif) alors que d'autre part l'antibiothérapie permettrait de tuer à la fois les nouvelles cellules ainsi que celles déjà ancrées à la paroi.

Environ 21 jours suite à l'enrôlement dans l'étude, on observe la tendance suivante : un plus grand nombre de patients sont séropositifs pour la présence d'anticorps contre la toxine B (TcdB) parmi les individus qui n'ont pas fait de rechute suite à la DACD que parmi ceux qui ont présenté au moins un épisode de rechute. Une

fois de plus, nos résultats sous-entendent que la réponse humorale contre l'antigène TcdB semble être impliquée, au moins en partie, dans l'issue des infections à *C. difficile*. Cette hypothèse est également appuyée par le fait qu'un plus grand nombre de patients qui se débarrassent des symptômes de leur DACD sans développer de complications ni faire de rechutes produisent des anticorps contre les antigènes de *C. difficile* (séroconversions). Cette proportion tend à être significativement plus élevée pour l'antigène TcdB. Il serait intéressant de vérifier si les patients qui ont fait une séroconversion et qui sont guéris sont toujours colonisés par la bactérie ou s'ils ne sont plus porteurs d'une souche de *C. difficile*. Un suivi de ces patients serait également approprié dans l'éventualité où ils contracteraient à nouveau une infection symptomatique à *C. difficile*.

Les associations entre la réponse humorale et la protection contre la colonisation ou l'infection par *C. difficile* que nous avons mises en évidence dans le cadre de ce projet, tant avec les patients de l'étude A qu'avec le groupe de l'étude B, concernent principalement la toxine B. Nos conclusions semblent surprenantes puisque les groupes qui ont étudié avant nous la production naturelle d'anticorps sériques au cours de l'infection par *C. difficile* ont en majorité constaté une protection contre l'apparition des symptômes ou contre la récurrence attribuable aux anticorps spécifiques à la toxine A (WARNY *et al.*, 1994, KYNE *et al.*, 2000, 2001, KATCHAR *et al.*, 2007). Jusqu'à récemment, la toxine A était considérée comme l'entérotoxine principale de la bactérie et des études sur des modèles animaux ont démontré que sa neutralisation pouvait contribuer à la résolution des symptômes de l'infection à *C. difficile* (KIM *et al.*, 1987, CORTHIER *et al.*, 1991). Les données générées par l'étude de Savidge (SAVIDGE *et al.*, 2003) de même que celle de Lyras (LYRAS *et al.*, 2009) présentent toutefois de nouvelles informations qui appuient les résultats de notre étude. En effet, leurs données

indiquent que ce serait la toxine B plutôt que la toxine A qui serait responsable des symptômes associés à l'infection à *C. difficile*. Ainsi, en théorie, la neutralisation de la toxine B seulement pourrait être suffisante pour protéger le patient contre le développement d'une infection et la survenue de complications ou de rechutes.

Dans le même ordre d'idées, nous ne sommes pas les seuls à avoir constaté que la toxine A et la toxine B n'entraînaient pas nécessairement une réponse similaire : un patient peut développer des anticorps contre la toxine B mais pas contre la toxine A, par exemple (VISCIDI *et al.*, 1983). Malgré la forte homologie entre les séquences en acides aminés des deux protéines, les anticorps dirigés contre la toxine A ne réagissent pas contre la toxine B, et vice versa (JOHNSON, 1997). Cela semble indiquer que les deux toxines présentent des épitopes différents et que l'efficacité de la neutralisation par les anticorps dirigés contre chacune des toxines pourrait varier considérablement.

En plus des anticorps dirigés contre les toxines, les patients de l'étude B ont également été testés pour la présence d'anticorps contre des antigènes de surface de *C. difficile*. Malheureusement, puisque ces patients ont été recrutés alors qu'ils présentaient déjà les symptômes de l'infection, nous n'avons pas pu déterminer si la présence d'anticorps sériques contre les préparations de flagellines prévenait la colonisation du tube digestif tel que discuté précédemment. S'il est vrai que les anticorps dirigés contre les antigènes de surface diminuent ou inhibent l'adhérence du pathogène aux muqueuses de l'hôte, les patients qui en ont produit n'ont pas pu être enrôlés dans cette étude puisqu'ils n'ont jamais présenté les symptômes de la DACD. Par ailleurs, le fait que 60% des 35 patients qui ont fait une rechute suite à l'infection possédaient des anticorps contre la préparation de flagellines M au jour 21 nous permet d'émettre les hypothèses suivantes : 1) les anticorps détectés en utilisant cet antigène dans le test

ELISA ne sont pas spécifiques à *C. difficile*, 2) les anticorps contre les protéines de surface ne sont pas protecteurs contre la survenue des rechutes et 3) les anticorps contre les protéines de surface sont impliqués dans la protection contre la survenue des rechutes mais d'autres facteurs doivent également être présents.

Les conclusions, les questions et les hypothèses soulevées dans cette portion de notre étude nous ont permis d'élaborer un modèle hypothétique de la résolution des symptômes et de l'infection suite à la DACD (Figure 21).

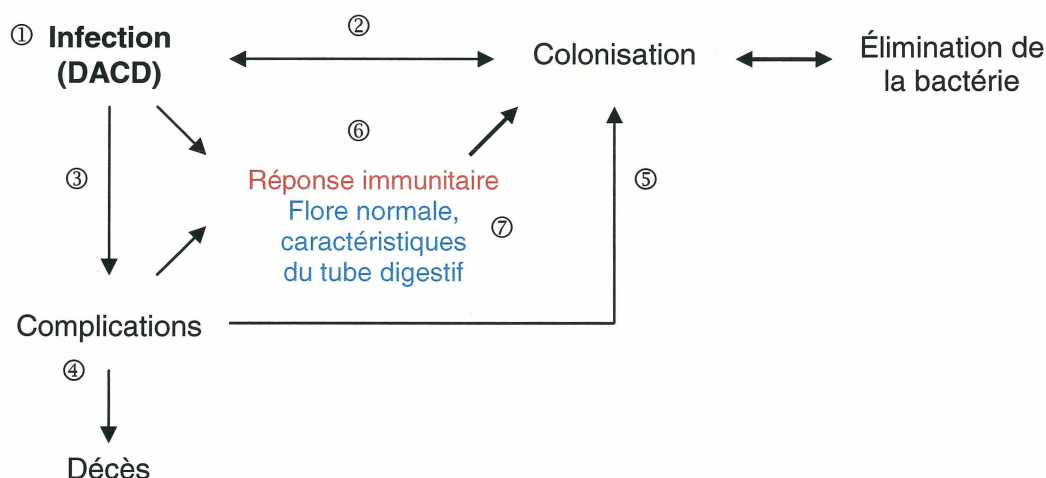


Figure 21. Modèle proposé selon les résultats de l'étude B

Le modèle proposé débute avec un patient présentant les symptômes d'une première infection à *C. difficile* (①). Dans beaucoup de cas, le patient verra ses symptômes résolus (②) suite au traitement ciblant la bactérie puis il éliminera la bactérie. Le patient peut toutefois développer une forme compliquée (③) de la maladie. Les complications peuvent entraîner le décès (④) du patient ou être traitées avec succès (⑤). Les infections à *C. difficile* présentent des taux de rechutes élevés. Les rechutes

sont dues à la persistance des spores de la bactérie dans le tractus digestif ou à la réinfection par une souche de l'environnement (MAROO et LAMONT, 2006). Au cours de l'infection (compliquée ou non), nous avons constaté que le patient produisait des anticorps (®) contre les différents antigènes de la bactérie. Nos résultats nous portent à croire que la réponse humorale, particulièrement celle dirigée contre la toxine B native, joue un rôle dans la protection contre le développement de complications suite à l'infection, incluant la survenue de rechutes, et est impliquée dans la résolution des symptômes. En accord avec les observations générées par les analyses des échantillons des patients du groupe A, d'autres facteurs de l'hôte (Ⓣ) et/ou des caractéristiques particulières à la souche bactérienne sont certainement impliqués de façon importante.

Les hypothèses présentées dans la section 4.4.1 portant sur le rôle des S-IgA, des anticorps sériques dirigés contre d'autres antigènes que les toxines A et B, de la flore normale et des propriétés anatomiques et physiologiques du tube digestif de l'hôte demeurent plausibles à la lueur des résultats des patients du groupe B. Toutes ces avenues devront être explorées plus extensivement dans des travaux futurs afin de mieux comprendre les causes des différentes manifestations des infections à *C. difficile*.

Un des objectifs du projet était d'évaluer si des protocoles d'immunisation comme l'injection de préparations d'immunoglobulines ou la vaccination pouvaient avoir un effet thérapeutique chez l'humain. Nous avons confirmé que, de façon naturelle, une proportion d'individus produit des anticorps sériques contre plusieurs antigènes de *C. difficile* et le potentiel protecteur de ces immunoglobulines a pu être démontré par nos travaux. Les patients que nous avons suivis durant un épisode de DACD nosocomiale font significativement plus de séroconversions pour les anticorps dirigés contre les

toxines A et B que les patients qui demeurent sains (étude A) et nous avons observé que les individus qui ne font pas de complications ou de rechutes suite à l'infection sont plus souvent séropositifs pour les anticorps dirigés contre la toxine B (étude B). Ces observations indiquent qu'une réponse humorale systémique contre ces antigènes est mise en place chez certains patients suite à une première infection par la bactérie et que cette réponse semble impliquée dans la protection contre les symptômes sévères et les rechutes. Comme une réponse anti-*C. difficile* n'est pas apparente chez tous les individus, il serait certainement intéressant de la remplacer ou de l'optimiser en injectant une préparation d'immunoglobulines ou en vaccinant les individus contre les antigènes des toxines. Malheureusement, certains patients qui présentent des titres élevés d'anticorps sériques neutralisants contre les antigènes de *C. difficile* ne semblent pas bénéficier d'une protection. Il pourrait alors être difficile de déterminer si, par exemple, un patient qui réagit bien à la vaccination et qui développe des anticorps sériques va être protégé adéquatement contre l'infection. Il faut également garder en tête que le fait qu'un patient ne présente pas ou très peu d'anticorps contre certains antigènes choisis de *C. difficile* ne signifie pas qu'un patient n'est pas en mesure de développer une réponse humorale spécifique à la bactérie. L'étude de la protection médiée par les anticorps IgA sécrétoires nous fournirait des indications supplémentaires quant à la nature du vaccin et la voie d'administration qui permettraient de générer une protection maximale de la muqueuse. Comme nous en avons discuté précédemment, la combinaison de plusieurs thérapies, dont la vaccination systémique et muqueuse, de même que l'utilisation de méthodes adéquates de contrôle des infections semblent certainement être les meilleures stratégies à adopter dans la lutte contre *C. difficile*.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Eric Frost de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir guidée tout au long de la réalisation de ce projet. Je remercie également le Dre Sophie Michaud pour sa collaboration et son soutien. Merci aux membres du jury pour la correction de ce mémoire, soit le Dr Louis-Charles Fortier et le Dr Brian Talbot.

Un merci tout spécial à Sylvie Deslandes pour toute l'aide technique ainsi que pour le support prodigué au cours des années que j'ai passées à Sherbrooke. Merci aussi à Normand Laframboise pour sa bonne humeur et ses encouragements.

Je remercie les entreprises ainsi que les chercheurs qui ont fourni les antigènes utilisés dans le cadre de ces travaux : Acambis (toxines et toxoïdes purifiés), BioMérieux (toxines recombinantes), Dre Susan Logan (préparations de flagellines), Dre Anne Collignon et Dre Séverine Péchiné (clones porteurs du gène *fliD*). Merci également à toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce projet : le Dre Vivian Loo ainsi que les membres du Consortium de recherche sur le *C. difficile*, le Dr Louis Valiquette et son infirmière de recherche Andrée Giguère, les membres des laboratoires du Dr Frost et du Dre Michaud ainsi que les stagiaires qui ont été impliqués dans le projet. Merci aussi à Catherine Desrosiers, Johanne Toutant, Henri-Paul Perreault, Françoise Camiré et Marie-Claude Marcoux.

Finalement, merci à Guillaume Tremblay pour avoir surpassé mes attentes en programmant une macro impressionnante qui m'a sauvé un nombre incalculable de journées de travail. Merci également à toute ma famille de m'avoir toujours supportée (endurée?) et de m'avoir permis de me rendre jusqu'ici!

BIBLIOGRAPHIE

Articles scientifiques

Aas J., Gessert C.E. and Bakken J.S. 2003. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. Clin Infect Dis **36**(5):580-585.

Aboudola S., Kotloff K.L., Kyne L., Warny M., Kelly E.C., Sougioultzis S., Giannasca P.J., Monath T.P. and Kelly C.P. 2003. *Clostridium difficile* vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. Infect Immun **71**(3):1608-1610.

Ackermann G., Thomalla S., Ackermann F., Schaumann R., Rodloff AC. and Ruf B.R. 2005. Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in an outbreak situation of antibiotic-associated diarrhea. J Med Microbiol **54**(Pt 2):149-153.

Åkerlund T., Svenungsson B., Lagergren A. and Burman L.G. 2006. Correlation of Disease Severity with Fecal Toxin Levels in Patients with *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea and Distribution of PCR Ribotypes and Toxin Yields In Vitro of Corresponding Isolates. J Clin Microbiol **44**(2):353-358.

Åkerlund T., Persson I., Unemo M., Norén T., Svenungsson B., Wullt M. and Burman L.G. 2008. Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* type 027/NAP1. J Clin Microbiol **46**(4):1530-1533.

Alfa M.J., Kabani A., Lyerly D., Moncrief S., Neville L.M., Al-Barrak A., Harding G.K., Dyck B., Olekson K. and Embil J.M. 2000. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol **38**(7):2706-2714.

Anjuère F. and Czerkinsky C. 2007. Immunité muqueuse et vaccination. Médecine/Sciences **23**:371-378.

Arroyo L.G., Kruth S.A., Willey B.M., Staempfli H.R., Low D.E. and Weese JS. 2005. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J Med Microbiol **54**:163–166.

Aznar S. and Lacal J.C. 2001. Rho signals to cell growth and apoptosis. Cancer Lett **165**(1):1-10.

Bacon A.E. 3rd and Fekety R. 1994. Immunoglobulin G directed against toxins A and B of *Clostridium difficile* in the general population and patients with antibiotic-associated diarrhea. Diagn Microbiol Infect Dis **18**(4):205-209.

Barbut F., Corthier G., Charpak Y., Cerf M., Monteil H., Fosse T., Trévoux A., De Barbeyrac B., Boussougant Y., Tigaud S., Tytgat F., Sédallian A., Duborgel S., Collignon A., Le Guern M.E., Bernasconi P. and Petit J.C. 1996. Prevalence and Pathogenicity of *Clostridium difficile* in Hospitalized Patients. A French Multicenter Study. Arch Intern Med **156**(13):1449-1454.

Barbut F., Mastrantonio P., Delmée M., Brazier J., Kuijper E., Poxton I.; European Study Group on Clostridium difficile (ESGCD). 2007. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect **13**(11):1048-1057.

Barth H., Aktories K., Popoff M.R. and Stiles B.G. 2004. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. Microbiol Mol Biol Rev **68**(3):373-402.

Bartlett J.G. and Perl T.M. 2005. The new *Clostridium difficile*--what does it mean? N Engl J Med **353**(23):2503-2505.

Bartlett J.G. 2006. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. Ann Intern Med **145**(10):758-764.

Bartlett J.G. 2007. *Clostridium difficile* : Old and new observations. J Clin Gastroenterol **41**(S1):524-529.

Bartlett J.G. 2008a. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. Clin Infect Dis **46**(S1):S4-S11.

Bartlett J.G. and Gerding D.N. 2008b. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. Clin Infect Dis **46**(S1):S12–S18.

Bauer M.P., Goorhuis A., Koster T., Numan-Ruberg S.C., Hagen E.C., Debast S.B., Kuijper E.J. and van Dissel J.T. 2008. Community-onset *Clostridium difficile*-associated diarrhoea not associated with antibiotic usage--two case reports with review of the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. Neth J Med **66**(5):207-211.

Berman L., Carling T., Fitzgerald T.N., Bell R.L., Duffy A.J., Longo W.E. and Roberts K.E. 2008. Defining surgical therapy for pseudomembranous colitis with toxic megacolon. J Clin Gastroenterol **42**(5):476-480.

Bignardi G.E. 1998. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect **40**(1):1-15.

Bojesen A.M., Olsen K.E. and Bertelsen M.F. 2006. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. Vet Microbiol **116**(4):329-335.

Borriello S.P. 1998. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother **41**(Suppl C):13-19.

Bouza E., Peláez T., Alonso R., Catalán P., Muñoz P. and Créixems M.R. 2001. "Second-look" cytotoxicity: an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD. J Hosp Infect **48**(3):233-237.

Brandtzaeg P. 2003. Role of secretory antibodies in the defence against infections. Int J Med Microbiol **293**(1):3-15.

Braun V., Hundsberger T., Leukel P., Sauerborn M. and von Eichel-Streiber C. 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* **181**(1-2):29-38.

Brazier J.S. 1998. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* **41**(Suppl. C):47-57.

Buchwald U.K. and Pirofski L. 2003. Immune Therapy for Infectious Diseases at the Dawn of the 21st Century: the Past, Present and Future Role of Antibody Therapy, Therapeutic Vaccination and Biological Response Modifiers. *Curr Pharm Des* **9**(12):945-968.

Calabi E., Calabi F., Phillips A.D. and Fairweather N.F. 2002. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* **70**(10):5770-5778.

Carter G.P., Lyras D., Allen D.L., Mackin K.E., Howarth P.M., O'Connor J.R. and Rood J.I. 2007. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J Bacteriol* **189**(20):7290–7301.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005). Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. *Morb Mortal Wkly Rep* **54**(47):1201-1205.

Cerquetti M., Molinari A., Sebastianelli A., Diociaiuti M., Petruzzelli R., Capo C. and Mastrantonio P. 2000. Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates. *Microb Pathog* **28**(6):363–372.

Cerutti A. and Rescigno M. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* **28**(6):740-750.

Chang S.Y. and Song K.P. 2001. ADP-ribosylating binary toxin genes of *Clostridium difficile* strain CCUG 20309. *DNA Seq* **12**(2):115-120.

- Chen X., Kokkotou E.G., Mustafa N., Bhaskar K.R., Sougioultzis S., O'Brien M., Pothoulakis C. and Kelly C.P. 2006. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. J Biol Chem **281**(34):24449-24454.
- Chevallet M., Luche S. and Rabilloud T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Nature Protocols **1**(4):1852-1858.
- Clyne M. and Drumm B. 1997. Adherence of *Helicobacter pylori* to the gastric mucosa. Can J Gastroenterol **11**(3):243-248.
- Cohen S.H., Tang Y.J. and Silva J. Jr. 2000. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. J Infect Dis **181**(2):659–663.
- Conly J. 2000. *Clostridium difficile*-associated diarrhea - The new scourge of the health care facility. Can J Infect Dis **11**(1):25-27.
- Corthier G., Muller M.C., Wilkins TD., Lysterly D. and L'Haridon R. 1991. Protection against experimental pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A. Infect Immun **59**(3):1192-1195.
- Delmée M. 2001. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease, Clin Microbiol Infect **7**(8):411–416.
- Delmée M., Avesani V., Delferriere N. and Burtonboy G. 1990. Characterization of flagella of *Clostridium difficile* and their role in serogrouping reactions. J Clin Microbiol **28**(10):2210-2214.
- Delmée M., Van Broeck J., Simon A., Janssens M. and Avesani V. 2005. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. J Med Microbiol **54**(Pt 2):187-191.

Dial S., Alrasadi K., Manoukian C., Huang A. and Menzies D. 2004. Risk of *Clostridium difficile* diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies. *CMAJ* **171**(1):33-38.

Dingle T., Wee S., Mulvey G.L., Greco A., Kitova E.N., Sun J., Lin S., Klassen J.S., Palcic M.M., Ng K.K. and Armstrong G.D. 2008. Functional properties of the carboxy-terminal host cell-binding domains of the two toxins, TcdA and TcdB, expressed by *Clostridium difficile*. *Glycobiology* **18**(9):698-706.

Donskey C.J. 2004. The role of the intestinal tract as a reservoir for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis* **39**(2):219-226.

Drudy D., Calabi E., Kyne L., Sougioultzis S., Kelly E., Fairweather N. and Kelly C.P. 2004. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**(3):237-242.

Drudy D., Fanning S. and Kyne L. 2007. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int J Infect Dis* **11**(1):5-10.

Du T. and Alfa M.J. 2004. Translocation of *Clostridium difficile* toxin B across polarized Caco-2 cell monolayers is enhanced by toxin A. *Can J Infect Dis* **15**(2):83-88.

Dubberke E.R., Reske K.A., Noble-Wang J., Thompson A., Killgore G., Mayfield J., Camins B., Woeltje K., McDonald J.R., McDonald L.C. and Fraser V.J. 2007. Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *Am J Infect Control* **35**(5):315-318.

Dumford D.M. 3rd, Nerandzic M.M., Eckstein B.C. and Donskey C.J. 2009. What is on that keyboard? Detecting hidden environmental reservoirs of *Clostridium difficile* during an outbreak associated with North American pulsed-field gel electrophoresis type 1 stains. *Am J Infect Control* **37**(1):15-19.

Dupuy B., Govind R., Antunes A. and Matamouros S. 2008. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol* **57**(Pt 6):685-689.

Egerer M., Giesemann T., Jank T., Satchell K.J. and Aktories K. 2007. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. J Biol Chem **282**(35):25314-25321.

Ellison D.W., Lawrenz M.B. and Miller V.L. 2004. Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA. Trends Microbiol **12**(6):296-300.

Engvall E. and Perlmann P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol **109**(1):129-135.

Éveillard M., Fourel V., Barc M.C., Kernéis S., Coconnier M.H., Karjalainen T., Bourlioux P. and Servin A.L. 1993. Identification and characterization of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT29 cells in culture. Mol Microbiol **7**(3):371-381.

Fagarasan S. and Honjo T. 2004. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. Curr Opin Immunol **16**(3):277-83.

Fekety R. 1997. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am J Gastroenterol **92**(5):739–750.

Fenger R.V., Linneberg A., Tvede M. and Ostergaard C. 2009. Increasing seroprevalence of *Clostridium difficile* in an adult Danish general population. Epidemiol Infect **137**(2):278-283.

Fletcher K.R. and Cinalli M. 2007. Identification, Optimal Management, and Infection Control Measures for *Clostridium difficile*-Associated Disease in Long-Term Care. Geriatr Nurs **28**(3):171-181.

Frey A., Di Canzio J. and Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. J Immunol Methods **221**(1-2):35-41.

Garey K.W., Sethi S., Yadav Y. and DuPont H.L. 2008. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect **70**(4):298-304.

George W.L., Rolfe R.D., Sutter V.L., and Finegold S.M. 1979a. Diarrhea and colitis associated with antimicrobial therapy in man and animals. Am J Clin Nutr **32**(1):251-257.

George W.L., Sutter V.L., Citron D. and Finegold S.M. 1979b. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol **9**(2):214-219.

George W.L. 1980. Antimicrobial agent-associated colitis and diarrhea. West J Med **133**(2):115-123.

Gerding D.N., Muto C.A. and Owens R.C. Jr. 2008. Treatment of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis **46**(S1):S32-42.

Geric B., Carman R.J., Rupnik M., Genheimer C.W., Sambol S.P., Lysterly D.M., Gerding D.N. and Johnson S. 2006. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. J Infect Dis **193**(8):1143-1150.

Giannasca P.J., Zhang Z.X., Lei W.D., Boden J.A., Giel M.A., Monath T.P. and Thomas W.D. Jr. 1999. Serum antitoxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from *Clostridium difficile* disease in hamsters. Infect Immun **67**(2):527-538.

Giannasca P.J. and Warny M. 2004. Active and passive immunization against *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. Vaccine **22**(7):848-856.

Giannella R.A., Broitman S.A. and Zamcheck N. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. Gut **13**(4):251-256.

Giesemann T., Egerer M., Jank T. and Aktories K. 2008. Processing of *Clostridium difficile* toxins. J Med Microbiol **57**:690-696.

Goh S., Riley T.V. and Chang B.J. 2005. Isolation and characterization of temperate bacteriophages of *Clostridium difficile*. Appl Environ Microbiol **71**(2):1079-1083.

Gonçalves C., Decré D., Barbut F., Burghoffer B. and Petit J.C. 2004. Prevalence and Characterization of a Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol **42**(5):1933–1939.

Goorhuis A., Bakker D., Corver J., Debast S.B., Harmanus C., Notermans D.W., Bergwerff A.A., Dekker F.W. and Kuijper E.J. 2008. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis **47**(9):1162-1170.

Gülke I., Pfeifer G., Liese J., Fritz M., Hofmann F., Aktories K. and Barth H. 2001. Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. Infect Immun **69**(10):6004-6011.

Halsey J. 2008. Current and future treatment modalities for *Clostridium difficile*-associated disease. Am J Health Syst Pharm **65**(8):705-715.

Haslam S.C., Ketley J.M., Mitchell T.J., Stephen J., Burdon D.W. and Candy D.C. 1986. Growth of *Clostridium difficile* and production of toxins A and B in complex and defined media. J Med Microbiol **21**(4):293-297.

Hassoun A. and Ibrahim F. 2007. Use of intravenous immunoglobulin for the treatment of severe *Clostridium difficile* colitis. Am J Geriatr Pharmacother **5**(1):48-51.

Hennequin C., Janoir C., Barc M.C., Collignon A. and Karjalainen T. 2003. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. Microbiology **149**(Pt 10):2779-2787.

Hennequin C., Porcheray F., Waligora-Dupriet A., Collignon A., Barc M., Bourlioux P. and Karjalainen T. 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. Microbiology **147**(Pt 1):87-96.

Hinkson P.L., Dinardo C., DeCiero D., Klinger J.D. and Barker R.H. Jr. 2008. Tolevamer, an anionic polymer, neutralizes toxins produced by the BI/027 strains of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(6):2190-2195.

Hubert B., Loo V.G., Bourgault A.M., Poirier L., Dascal A., Fortin E., Dionne M. and Lorange M. 2007. A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Québec. *Clin Infect Dis* **44**(2):238-244.

Hundsberger T., Braun V., Weidmann M., Leukel P., Sauerborn M. and von Eichel-Streiber C. 1997. Transcription analysis of the genes *tcdA–E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem* **244**(3):735–42.

Husebye E. 2005. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy* **51**(S1):1-22.

Ikeda T., Oosawa K. and Hotani H. 1996. Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure. *J Mol Biol* **259**(4):679-86.

Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ). 2008. Surveillance des diarrhées associées à *Clostridium difficile* au Québec – Bilan du 9 décembre 2007 au 31 mars 2008.

Isakow W., Morrow L.E. and Kollef M.H. 2007. Probiotics for preventing and treating nosocomial infections: review of current evidence and recommendations. *Chest* **132**(1):286-294.

Jaffe A.B. and Hall A. 2005. Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:247–269.

Janeway C.A. Jr and Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**:197–216.

Jank T., Gieseemann T. and Aktories K. 2007. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology* **17**(4):15R-22R.

Janoir C., Péchiné S., Grosdidier C. and Collignon A. 2007. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol* **189**(20):7174-7180.

Jodlowski T.Z., Oehler R., Kam L.W. and Melnychuk I. 2006. Emerging therapies in the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Ann Pharmacother* **40**(12):2164-2169.

Johnson S., Homann S.R., Bettin K.M., Quick J.N., Clabots C.R., Peterson L.R. and Gerding D.N. 1992a. Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **117**(4):297-302.

Johnson S., Gerding D.N. and Janoff E.N. 1992b. Systemic and mucosal antibody responses to toxin A in patients infected with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* **166**(6):1287-1294.

Johnson S. 1997. Antibody responses to clostridial infection in humans. *Clin Infect Dis* **25**(S2):S173-177.

Just I. and Gerhard R. 2004. Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**:23-47.

Kamiya S., Reed P.J. and Borriello S.P. 1989. Purification and characterisation of *Clostridium difficile* toxin A by bovine thyroglobulin affinity chromatography and dissociation in denaturing conditions with or without reduction. *J Med Microbiol* **30**(1):69-77.

Katchar K., Taylor C.P., Tummala S., Chen X., Sheikh J. and Kelly C.P. 2007. Association between IgG2 and IgG3 subclass responses to toxin A and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**(6):707-713.

- Kato H., Kato N., Watanabe K., Ueno K., Ushijima H., Hashira S. and Abe T. 1994. Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol **32**(9):2067-2070.
- Keel K., Brazier J.S., Post K.W., Weese S. and Songer J.G. 2007. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. J Clin Microbiol **45**(6):1963-1964.
- Keller M.A. and Stiehm E.R. 2000. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. Clin Microbiol Rev **13**(4):602-614.
- Kelly C.P., Pothoulakis C., Orellana J. and LaMont J.T. 1992. Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. Gastroenterology **102**(1):35-40.
- Kelly C.P. 1996. Immune response to *Clostridium difficile* infection. Eur J Gastroenterol Hepatol **8**(11):1048-1053.
- Kenny E.F. and O'Neill L.A. 2008. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. Cytokine **43**(3):342-349.
- Kim J., Smathers S.A., Prasad P., Leckerman K.H., Coffin S. and Zaoutis T. 2008. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. Pediatrics **122**(6):1266-1270.
- Kim P.H., Iaconis J.P. and Rolfe R.D. 1987. Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocectitis and transfer of protection to infant hamsters. Infect Immun **55**(12):2984-2992.
- Knoop F.C., Owens M. and Crocker I.C. 1993. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. Clin Microbiol Rev **6**(3):251-265.
- Komatsu M., Kato H., Aihara M., Shimakawa K., Iwasaki M., Nagasaka Y., Fukuda S., Matsuo S., Arakawa Y., Watanabe M. and Iwatani Y. 2003. High frequency of antibiotic-

associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22**(9):525-529.

Kotloff K.L., Wasserman S.S., Losonsky G.A., Thomas W. Jr, Nichols R., Edelman R., Bridwell M. and Monath T.P. 2001. Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. Infect Immun **69**(2):988-995.

Krivan H.C. and Wilkins T.D. 1987. Purification of *Clostridium difficile* toxin A by affinity chromatography on immobilized thyroglobulin. Infect Immun **55**(8):1873-1877.

Kuijper E.J., de Weerd J., Kato H., Kato N., van Dam A.P., van der Vorm E.R., Weel J., van Rhee C. and Dankert J. 2001. Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **20**(8):528-534.

Kuijper E.J., Coignard B., Tüll P.; ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect **12**(S6):2-18.

Kuijper E.J., Coignard B., Brazier J.S., Suetens C., Drudy D., Wiuff C., Pituch H., Reichert P., Schneider F., Widmer A.F., Olsen K.E., Allerberger F., Notermans D.W., Barbut F., Delmée M., Wilcox M., Pearson A., Patel B.C., Brown D.J., Frei R., Akerlund T., Poxton I.R. and Tüll P. 2007. Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. Euro Surveill **12**(6):E1-2.

Kyne L., Warny M., Qamar A. and Kelly C.P. 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. N Engl J Med **342**(6):390-397.

Kyne L., Warny M., Qamar A. and Kelly C.P. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. Lancet **357**(9251):189-193.

Labbé A.C., Poirier L., Maccannell D., Louie T., Savoie M., Béliveau C., Laverdière M. and Pépin J. 2008. *Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(9):3180-3187.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.

Le Bouquéne C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**(6-7):471-478.

Letourneur O., Ottone S., Delauzun V., Bastide M.C. and Foussadier A. 2003. Molecular cloning, overexpression in *Escherichia coli*, and purification of 6x his-tagged C-terminal domain of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Protein Expr Purif* **31**(2):276-285.

Loo V.G., Poirier L., Miller M.A., Oughton M., Libman M.D., Michaud S., Bourgault A.M., Nguyen T., Frenette C., Kelly M., Vibien A., Brassard P., Fenn S., Dewar K., Hudson T.J., Horn R., René P., Monczak Y. and Dascal A. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* **353**(23):2442-2449.

Louie TJ, Emery J, Krulicki W, Byrne B, Mah M. 2009. OPT-80 eliminates *Clostridium difficile* and is sparing of bacteroides species during treatment of *C. difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(1):261-263.

Lycke N., Erlandsson L., Ekman L., Schön K. and Leanderson T. 1999. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J Immunol* **163**(2):913-919.

Lyerly D.M., Saum K.E., MacDonald D.K. and Wilkins T.D. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* **47**(2):349-352.

Lyras D., O'Connor J.R., Howarth P.M., Sambol S.P., Carter G.P., Phumoonna T., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S., Gerding D.N. and Rood J.I. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* **458**(7242):1176-1179.

MacCannell D.R., Louie T.J., Gregson D.B., Laverdiere M., Labbe A.C., Laing F. and Henwick S. 2006. Molecular Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027 Isolates from Eastern and Western Canada. *J Clin Microbiol* **44**(6):2147–2152.

Magalhaes J.G., Tattoli I. and Girardin S.E. 2007. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* **19**(2):106-115.

Mani N. and Dupuy B. 2001. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *PNAS* **98**(10):5844-5849.

Manson J.M., Rauch M. and Gilmore M.S. 2008. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* **635**:15-28.

Maroo S. and Lamont J.T. 2006. Recurrent *Clostridium difficile*. *Gastroenterology* **130**(4):1311–1316.

Matamouros S., England P. and Dupuy B. 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* **64**(5):1274–1288.

McCracken V.J. and Lorenz R.G. 2001. The gastrointestinal ecosystem : a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* **3**(1):1-11.

McDonald L.C., Killgore G.E., Thompson A., Owens R.C. Jr, Kazakova S.V., Sambol S.P., Johnson S. and Gerding D.N. 2005. An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium difficile*. *NEJM* **353**(23):2433-2441.

McFarland L.V., Beneda H.W., Clarridge J.E. and Raugi G.J. 2007. Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *Am J Infect Control* **35**(4):237-53.

McFarland L.V., Surawicz C.M., Rubin M., Fekety R., Elmer G.W. and Greenberg R.N. 1999. Recurrent *Clostridium difficile* disease: epidemiology and clinical characteristics. Infect Control Hosp Epidemiol **20**(1):43-50.

McGeer A.J. and Low D.E. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. Semin Respir Infect **15**(4):314-326.

McPherson S., Rees C.J., Ellis R., Soo S. and Panter S.J. 2006. Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. Dis Colon Rectum **49**(5):640-645.

McVay C.S. and Rolfe R.D. 2000. In vitro and in vivo activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. Antimicrob Agents Chemother **44**(9):2254–2258.

Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol **1**(2):135-145.

Merz C.S., Kramer C., Forman M., Gluck L., Mills K., Senft K., Steiman I., Wallace N. and Charache P. 1994. Comparison of four commercially available rapid enzyme immunoassays with cytotoxin assay for detection of *Clostridium difficile* toxin(s) from stool specimens. J Clin Microbiol **32**(5):1142-1147.

Modena S., Gollamudi S. and Friedenber F. 2006. Continuation of antibiotics is associated with failure of metronidazole for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Gastroenterol **40**(1):49–54.

Morgan O.W., Rodrigues B., Elston T., Verlander N.Q., Brown D.F., Brazier J. and Reacher M. 2008. Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: a case-case study. PLoS ONE **3**(3):e1812.

Morinville V. and McDonald J. 2005. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in 200 Canadian children. Can J Gastroenterol **19**(8):497-501.

- Murphy C., Vernon M. and Cullen M. 2006. Intravenous immunoglobulin for resistant *Clostridium difficile* infection. *Age Ageing*. **35**(1):85-86.
- Musher D.M., Logan N., Mehendiratta V., Melgarejo N.A., Garud S. and Hamill R.J. 2007. *Clostridium difficile* colitis that fails conventional metronidazole therapy: response to nitazoxanide. *J Antimicrob Chemother* **59**(4):705-710.
- Mylonakis E., Ryan E.T. and Calderwood S.B. 2001. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a review. *Arch Intern Med* **161**(4):525-533.
- Nachnani J.S., Bulchandani D. and Allen M.J. 2008. Proton pump inhibitors are an independent risk factor for an increased length of hospital stay in patients with *Clostridium difficile* infection. *Indian J Gastroenterol* **27**(4):171-172.
- Ní Eidhin D.B., O'Brien J.B., McCabe M.S., Athié-Morales V. and Kelleher D.P. 2008. Active immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using surface-layer protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**(2):207-218.
- Nottrott S., Schoentaube J., Genth H., Just I. and Gerhard R. 2007. *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis is p53-independent but depends on glucosylation of Rho GTPases. *Apoptosis* **12**(8):1443-1453.
- Ochsner U.A., Bell S.J., O'Leary A.L., Hoang T., Stone K.C., Young C.L., Critchley I.A. and Janjic N. 2009. Inhibitory effect of REP3123 on toxin and spore formation in *Clostridium difficile*, and *in vivo* efficacy in a hamster gastrointestinal infection model. *J Antimicrob Chemother* **63**(5):964-971.
- Onderdonk A.B., Lowe B.R. and Bartlett J.G. 1979. Effect of environmental stress on *Clostridium difficile* toxin levels during continuous cultivation. *Appl Environ Microbiol* **38**(4):637-41.
- Osgood D.P., Wood N.P. and Sperry J.F. 1993. Nutritional aspects of cytotoxin production by *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol* **59**(12):3985-3988.

- Owens R.C. Jr, Donskey C.J., Gaynes R.P., Loo V.G. and Muto C.A. 2008. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis **46**(S1):S19-31.
- Pálffy R., Gardlík R., Behuliak M., Kadasi L., Turna J. and Celec P. 2009. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. Mol Med **15**(1-2):51-59.
- Paredes-Sabja D., Bond C., Carman R.J., Setlow P. and Sarker M.R. 2008. Germination of spores of *Clostridium difficile* strains, including isolates from a hospital outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). Microbiology **154**(Pt 8):2241-2250.
- Péchiné S., Gleizes A., Janoir C., Gorges-Kergot R., Barc M.C., Delmée M. and Collignon A. 2005a. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol **54**(Pt 2):193-196.
- Péchiné S., Janoir C. and Collignon A. 2005b. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. J Clin Microbiol **43**(10):5018-5025.
- Péchiné S., Janoir C., Boureau H., Gleizes A., Tsapis N., Hoys S., Fattal E. and Collignon A. 2007. Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. Vaccine **25**(20):3946-54.
- Pépin J., Valiquette L., Alary M.E., Villemure P., Pelletier A., Forget K., Pépin K., and Chouinard D. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ **171**(5):466-472.
- Perelle S., Gibert M., Bourlioux P., Corthier G. and Popoff M.R. 1997. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. Infect Immun **65**(4):1402-1407.

Pfeifer G., Schirmer J., Leemhuis J., Busch C., Meyer D.K., Aktories K. and Barth H. 2003. Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J Biol Chem* **278**(45):44535-44541.

Planche T., Aghaizu A., Holliman R., Riley P., Poloniecki J., Breathnach A. and Krishna S. 2008. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis* **8**(12):777-784.

Popoff M.R., Rubin E.J., Gill D.M. and Boquet P. 1988. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* **56**(9):2299-2306.

Pothoulakis C. and Lamont J.T. 2001. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions. II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**(2):G178–G183.

Poutanen S.M. and Simor A.E. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ* **171**(1):51-58.

Poxton I.R. 2008. *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* **57**:683-684.

Privitera G., Scarpellini P., Ortisi G., Nicastro G., Nicolin R. and de Lalla F. 1991. Prospective study of *Clostridium difficile* intestinal colonization and disease following single-dose antibiotic prophylaxis in surgery. *Antimicrob Agents Chemother* **35**(1):208-210.

Qazi O., Hitchen P., Tissot B., Panico M., Morris H.R., Dell A. and Fairweather N. 2008. Mass spectrometric analysis of the S-layer proteins from *Clostridium difficile* demonstrates the absence of glycosylation. *J Mass Spectrom* **44**(3):368-374.

Ramos H.C., Rumbo M. and Sirard J.C. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* **12**(11):509-517.

Razavi B., Apisarnthanarak A. and Mundy L.M. 2007. *Clostridium difficile*: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance. *Infection* **35**(5):300-307.

Reineke J., Tenzer S., Rupnik M., Koschinski A., Hasselmayer O., Schrattenholz A., Schild H. and von Eichel-Streiber C. 2007. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **446**(7134):415-419.

Riegler M., Sedivy R., Pothoulakis C., Hamilton G., Zacherl J., Bischof G., Cosentini E., Feil W., Schiessel R., LaMont J.T. and Wenzl E. 1995. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest* **95**(5):2004-2011.

Riley T.V. 2004. Nosocomial diarrhoea due to *Clostridium difficile*. *Curr Opin Infect Dis* **17**(4):323-327.

Rodriguez-Palacios A., Staempfli H.R., Duffield T. and Weese J.S. 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* **13**(3):485-487.

Rothman S.W., Brown J.E., Diecidue A. and Foret D.A. 1984. Differential cytotoxic effects of toxins A and B isolated from *Clostridium difficile*. *Infect Immun* **46**(2):324-331.

Rupnik M., Avesani V., Janc M., von Eichel-Streiber C. and Delmée M. 1998. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J Clin Microbiol* **36**(8):2240-2247.

Rupnik M., Grabnar M. and Geric B. 2003. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* **9**(6):289–294.

Rupnik M. 2008a. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev* **32**(3):541-555.

Rupnik M., Widmer A., Zimmermann O., Eckert C. and Barbut F. 2008b. *Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. *J Clin Microbiol* **46**(6):2146.

Salcedo J., Keates S., Pothoulakis C., Warny M., Castagliuolo I., LaMont J.T. and Kelly C.P. 1997. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. *Gut* **41**(3):366-370.

Sánchez-Hurtado K., Corretge M., Mutlu E., McIlhagger R., Starr J.M. and Poxton I.R. 2008. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *J Med Microbiol* **57**(Pt 6):717-724.

Sauerborn M., Leukel P. and von Eichel-Streiber C. 1997. The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality. *FEMS Microbiol Lett* **155**(1):45-54.

Savidge T.C., Pan W.H., Newman P., O'brien M., Anton P.M. and Pothoulakis C. 2003. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* **125**(2):413-420.

Saxton K., Baines S.D., Freeman J., O'Connor R. and Wilcox M.H. 2009. Effects of exposure of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 to fluoroquinolones in a human gut model. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(2):412-420.

Schirmer J. and Aktories K. 2004. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim Biophys Acta* **1673**(1-2):66–74.

Sloan L.M., Duresko B.J., Gustafson D.R. and Rosenblatt J.E. 2008. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* **46**(6):1996-2001.

Sougioultzis S., Kyne L., Drudy D., Keates S., Maroo S., Pothoulakis C., Giannasca P.J., Lee C.K., Warny M., Monath T.P. and Kelly C.P. 2005. *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* **128**(3):764-770.

Spigaglia P and Mastrantonio P. 2002. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **40**(9):3470-3475.

Stamper P.D., Alcabasa R., Aird D., Babiker W., Wehrlin J., Ikpeama I. and Carroll K.C. 2009. Comparison of a commercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. J Clin Microbiol **47**(2):373-378.

Stare B.G., Delmée M. and Rupnik M. 2007. Variant forms of the binary toxin CDT locus and tcdC gene in *Clostridium difficile* strains. J Med Microbiol **56**(Pt 3):329-335.

Stieglbauer K.T., Gruber S.A. and Johnson S. 1995. Elevated serum antibody response to toxin A following splenic abscess due to *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis **20**(1):160-162.

Stubbs S., Rupnik M., Gibert M., Brazier J., Duerden B. and Popoff M. 2000. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett **186**(2):307-312.

Surawicz C.M., McFarland L.V., Greenberg R.N., Rubin M., Fekety R., Mulligan M.E., Garcia R.J., Brandmarker S., Bowen K., Borjal D. and Elmer G.W. 2000. The search for a better treatment for recurrent *C. difficile* disease: use of a high-dose vancomycin combined with *S. boulardii*. Clin Infect Dis **31**(4):1012-1017.

Surowiec D., Kuyumjian A.G., Wynd M.A. and Cicogna C.E. 2006. Past, present, and future therapies for *Clostridium difficile*-associated disease. Ann Pharmacother **40**(12):2155-2163.

Tan K.S., Wee B.Y. and Song K.P. 2005. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol **50**(7):613-619.

Tasteyre A., Karjalainen T., Avesani V., Delmée M., Collignon A., Bourlioux P. and Barc M.C. 2000. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (fliC) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. J Clin Microbiol **38**(9):3179-3186.

Tasteyre A., Karjalainen T., Avesani V., Delmée M., Collignon A., Bourlioux P. and Barc M.C. 2001a. Molecular characterization of fliD gene encoding flagellar cap and its

expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. J Clin Microbiol **39**(3):1178-1183.

Tasteyre A., Barc M.C., Collignon A., Boureau H. and Karjalainen T. 2001b. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. Infect Immun **69**(12):7937-7940.

Thomas C., Stevenson M. and Riley T.V. 2003. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review. J Antimicrob Chemother **51**(6):1339-1350.

Toyokawa M., Ueda A., Tsukamoto H., Nishi I., Horikawa M., Sunada A. and Asari S. 2003. Pseudomembranous colitis caused by toxin A-negative/toxin B-positive variant strain of *Clostridium difficile*. J Infect Chemother **9**(4):351-354.

Tsuji M., Suzuki K., Kinoshita K. and Fagarasan S. 2008. Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. Semin Immunol **20**(1):59-66.

Viscidi R., Laughon B.E., Yolken R., Bo-Linn P., Moench T., Ryder R.W. and Bartlett J.G. 1983. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. J Infect Dis **148**(1):93-100.

Viswanathan V.K., Hodges K. and Hecht G. 2009. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. Nat Rev Microbiol **7**(2):110-119.

Vollaard E.J. and Clasener H.A. 1994. Colonization resistance. Antimicrob Agents Chemother **38**(3):409-414.

Voth D.E. and Ballard J.D. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev **18**(2):247-263.

Waligora A.J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A. and Karjalainen T. 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun* **69**(4):2144-2153.

Warny M., Vaerman J.P., Avesani V. and Delmée M. 1994. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun* **62**(2):384-389.

Warny M., Pepin J., Fang A., Killgore G., Thompson A., Brazier J., Frost E. and McDonald L.C. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* **366**(9491):1079-1084.

Weiss K. 2009. Toxin-binding treatment for *Clostridium difficile*: a review including reports of studies with tolevamer. *Int J Antimicrob Agents* **33**(1):4-7.

Wilson K.H. 1993. The microecology of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* **16**(S4):S214-218.

Yeh C.Y., Lin C.N., Chang C.F., Lin C.H., Lien H.T., Chen J.Y. and Chia J.S. 2008. C-Terminal repeats of *Clostridium difficile* toxin A induce production of chemokine and adhesion molecules in endothelial cells and promote migration of leukocytes. *Infect Immun* **76**(3):1170–1178.

Yonekura K., Maki-Yonekura S. and Namba K. 2002. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol* **153**(4):191-197.

Zilberberg M.D., Shorr A.F. and Kollef M.H. 2008. Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005. *Emerg Infect Dis* **14**(6):929-931.

Ouvrage de référence

Goldsby R.A., Kindt T.J. et Osborne B.A. 2003. *IMMUNOLOGIE Le cours de Janis Kuby*, Dunod, Paris, 660 pages.

ANNEXE A

Séquence du gène de la toxine binaire et amorces

```

1  atgaaaaaat ttaggaaaca taaaaggatt agtaattgta tatctatatt gttgatatta
61  tatctaactt taggtggttt gttacctaataacattttatg cacaagactt acaaagctat
121 agtgaaaaag tttgcaatac tacttacaag gtccttatag aaagaccaga agatttttctt
181 aaagataaag aaaaggctaa agaatgggaa agaaaaagaag cagaaagaat agagcaaaaa
241 cttgaaagat ctgaaaaaga agcatttagaa tcatataaaa aagattctgt agaaataagt
301 aaataattctc agacaagaaa ttatttttat gattatcaaa tagaagcaaa ttctcgagaa
361 aaagaatata aagaacttcg aaatgctata tcaaaaaata aaatagataa acctatgtat
421 gtctattatt ttgaatctcc agaaaaattt gcatttaata aagtaataag aacagaaaaat
481 caaacgaaa ttctattaga aaaatttaata gagtttaaaag aaactataca aaacaaatta
541 ttttaagcaag atggatttaa agatattttct ttatatgaac ctggaaaaag tgatgaaaaa
601 cctacaccat tacttatgca cttaaaatta cctagaaata ctggtatgtt accatataca
661 aatactaaca atgtaagtac attaatagag caaggatata gtataaaaaat agataaaaatt
721 gttcgttatag ttatagatgg gaagcactat attaaagcag aagcatctgt tgtaagtgt
781 cttgatttta aagatgatgt aagtaagggg gactcttggg gtaaagcaaa ttataatgat
841 tggagtaata aattaacacc taatgaactt gctgatgtaa atgattatat gcgtggagga
901 tatactgcaa ttaataatta tttaatatca aatgggtccag taaataatcc taaccagaa
961 ttgatttcta aaatcacaaa cattgaaaat gcattaaaac gtgaacctat tccaactaat
1021 ttaactgtat atagaagatc tggctctcaa gaatttgggt taactcttac ttccctgaa
1081 tatgatttta acaaactaga aaatatagat gcttttaaat caaaatggga aggacaagca
1141 ctgctcttatc caaactttat tagtactagt attggtagtg tgaatatgag tgcatttgc
1201 aaaagaaaaa tagtactacg tataactata cctaaagggt ctctggagc ttatctatca
1261 gctattccag gttatgcagg tgaatatgaa gtgcttttaa atcatggaag caaattttaa
1321 atcaataaaa ttgattctta caaagatggg actataacaa aattaattgt tgatgcaaca
1381 ttgatacctt aatatttttt cacataaata atttaatat tttcaaattt aaggaggaga
1445 aacaatgaaa atacaaatga ggaataaaaa ggtattaagt tttttaacac ttacagctat
1501 agttagtcaa gcactagtat atcctgtata tgctcaaaact agtacaagta atcattctaa
1561 taagaaaaaa gaaattgtaa atgaagatat actcccaaac aatggattaa tgggatatta
1621 tttcacagat gagcacttta aagattttaa attaatggca ccataaaaag atggtaattt
1681 aaaatttgaa gaaaagaaag tagataaaact tctggataaa gacaaatcag atgtaaaatc
1741 tatacgatgg acaggaagaa taattccttc taaggatggg gaatatacat tatcaactga
1801 tagagatgat gtcttaatgc aagtaaatatc tgagagtact atatcaaata cacttaaagt
1861 taatatgaaa aagggttaaag aatataaagt tagaatagag ctacaagata aaaatttagg
1921 ttcaatagat aatttatcat cacctaactt ttattgggaa ttagatggtg tgaagaaaat
1981 tataccagaa gaaaatttat tcttaagaga ttatttctaat atagaaaaag atgatccatt
2041 tatcccaaat aacaatttct ttgacccaaa gttgatgtct gattgggaag acgaagattt
2101 ggatacagat aatgataata taccagattc atatgaacga aatggatata ctattaagga
2161 cttaattgca gttaagtggg aagatagttt tgcagaacaa ggctataaga aatatgtatc
2221 aaattattta gagtcaaata ctgctggaga tccatataca gattatgaaa aagcttcagg
2281 ttcttttgac aaggctataa agactgaagc aagagatccg ttagttgcag catatccaat
2341 tgttggagta ggtatggaaa aattaattat atctacaaat gaacatgcct ctactgatca
2401 aggtaaaact gtttcagag ctactactaa cagtaaaaact gaatctaata cagctggtgt
2461 gtctgttaat gtaggatatc aaaatggatt cacagctaata gtaactacaa attattccca
2521 tacaacagat aattcaactg ctgttcaaga tagtaatgga gaatcatgga atactggatt
2581 aagtataaac aaaggagaat ctgcataat aaatgcaaat gttagatatt acaacacagg
2641 tactgcacct atgtacaaag tgacaccaac aacaaattta gtgttagatg gagatacatt
2701 atcaactatc aaagcacaag aaaatcfaat tggcaataat ctatctctg gagatactta
2761 tcccaaaaaa gggctttcac ctctagctct taacacaatg gatcaattta gctctagact
2821 gattcctata aattatgatc aattaaaaaa attagatgct ggaaagcaaa ttaaattaga
2881 aacaacacaa gtaagtggaa attttggtag aaaaaatagt tctggacaaa tagtaacaga
2941 aggaaatagt tggtcagact atataagtca aattgacagt atttctgcat ctattatatt
3001 agatacagag aatgaatctt acgaaagaag agttactgct aaaaatttac aggatccaga
3061 agataaaaaca cctgaactta caattggaga agcaattgaa aaagcttttg gcgctactaa
3121 aaaagatggg ttgttatatt ttaatgatat accaatagat gaaagttgtg ttgaactcat
3181 atttgatgat aatacagcca acaagattaa agatagttaa aaaactttgt ctgataaaaa

```

Figure A1. Séquence du gène de la toxine binaire et positionnement des amorces pour l'amplification PCR

Clostridium difficile *CdtA* (*cdtA*) and *CdtB* (*cdtB*) genes, complete cds, numéro d'accension GenBank : AF271719 (CHANG et SONG, 2001); 1-1448 : gène *cdtA*, 1449-4075 : gène *cdtB*


```

3241 gatatataat gttaaacttg aaagaggaat gaatatactt ataaaaacac caacttactt
3301 tactaatttt gatgattata ataattaccc tagtacatgg agtaatgtca atactacgaa
3361 taaagatggg ttacaaggct cagcaaataa attaaatggg gagacgaaga ttaaaatccc
3421 tatgtctgag ctaaaacctt ataaacgtta tgtttttagt ggatattcaa aggatccttt
3481 aacatctaata tcaataattg taaagataaa agcaaaaagaa gagaaaacgg attatttggg
3541 accagaacaa ggatatacaa aatttagtta tgaatttgaa actactgaaa aagattcttc
3601 taatatagag ataacattaa ttggtagtgg tacaacatac ttagataact tatctattac
3661 agagctaaat agtactcctg aaatacttga tgaaccagaa gttaaaattc caactgacca
3721 agaaataata gatgcacata aaatatattt tgcagattta aattttaatc caagtacagg
3781 aaatacttat ataaatggta tgtattttgc accaacacaa actaataaag aagctctcga
3841 ttatatccaa aaatatagag ttgaagctac tttaacaatat tctggattta aagatattgg
3901 aactaaagat aaagaaatgc gtaattattt aggagatcca aatcagccta aaactaatta
3961 tgtaaatctt aggagttatt ttacaggtgg agaaaatatt atgacataca agaaattaag
4021 aatatatgca attactccag acgatagaga gttattagtt cttagtgttg attag

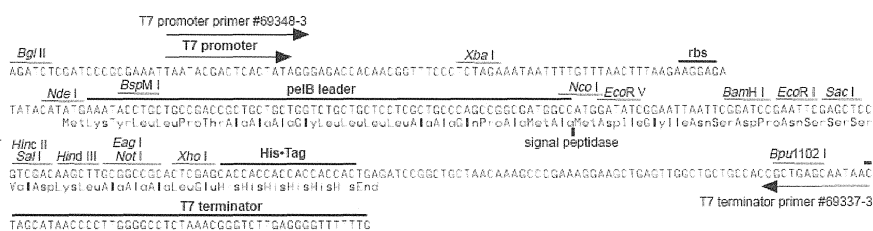
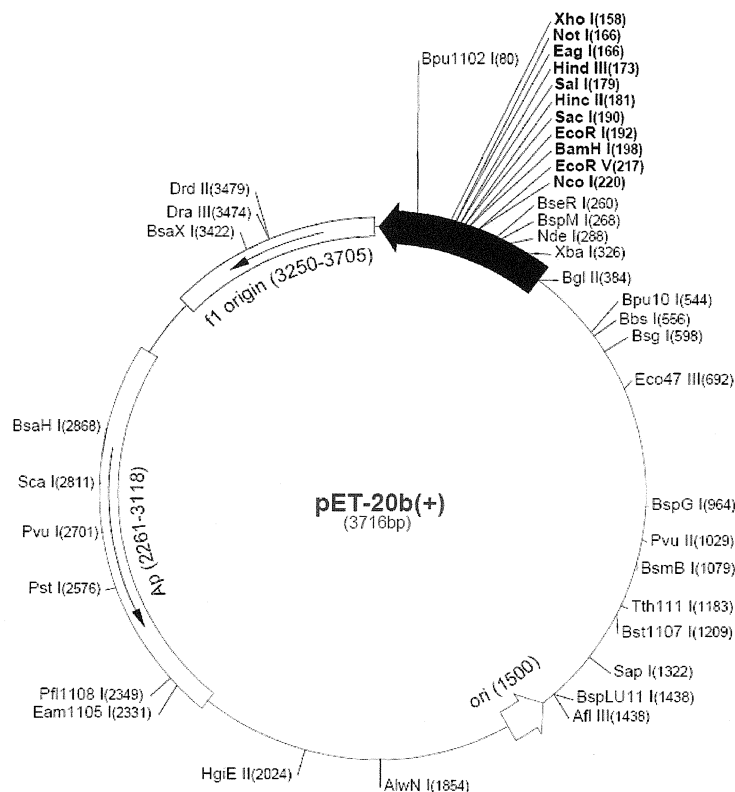
```

Figure A1, suite

ANNEXE B

Cartes des vecteurs utilisés (pET-20b(+) et pET-39b(+))

T7 promoter	353-369
T7 transcription start	352
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His ⁺ Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
pBR322 origin	1500
<i>bla</i> coding sequence	2261-3118
f1 origin	3250-3705



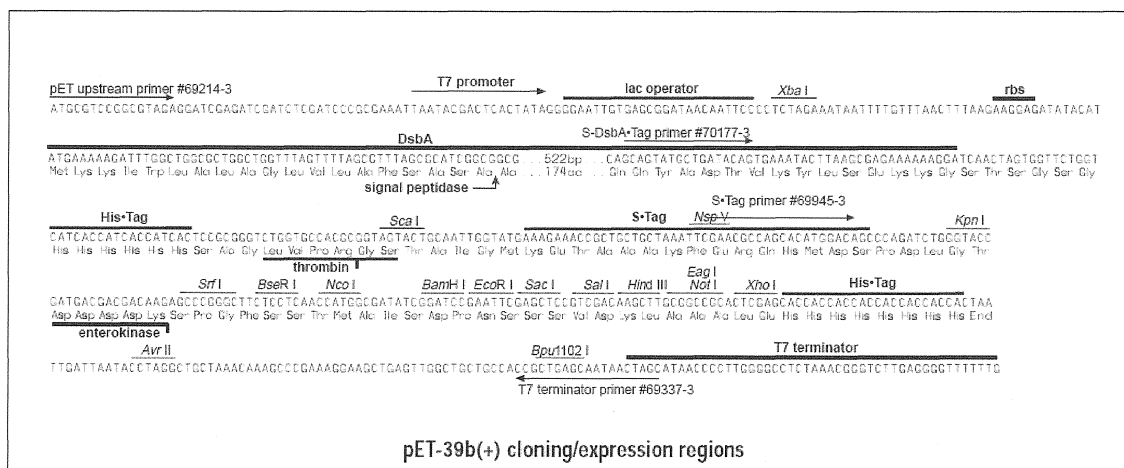
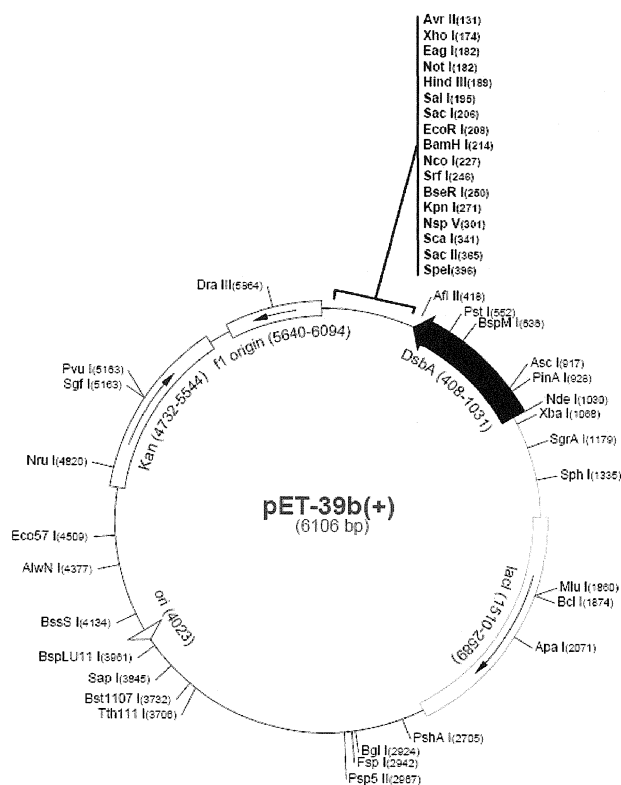
pET-20b(+) cloning/expression region

Figure A2. Carte du vecteur pET-20b(+)

Source : Novagen

pET-39b(+) sequence landmarks

T7 promoter	1103-1119
T7 transcription start	1102
DsbA• Tag™ coding seq.	408-1031
His• Tag® coding sequence	369-386
S• Tag™ coding sequence	282-326
Multiple cloning sites (<i>Srf</i> I - <i>Xho</i> I)	174-250
His• Tag coding sequence	150-173
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	1510-2589
pBR322 origin	4023
Kan coding sequence	4732-5544
f1 origin	5640-6094

**Figure A3.** Carte du vecteur pET-39b(+)

Source : Novagen

ANNEXE C

Protocole du PCR pour la détection des produits de ligation

Les amorces utilisées pour la détection des produits de ligation lors du clonage des fragments de la toxine binaire sont présentées dans le Tableau A1.

Tableau A1. Séquences des amorces utilisées pour la détection des produits de ligation

Amorce	Séquence (5'-3')
T7F^A	TAATACGACTCACTATAGGG
CdBin1113R^B	TAATCCAGTATTCCATGATTCTCC
CdBin2379F^B	AATAAAGAAGCTCTCGATTATATCCA
T7R^A	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

^A: Les amorces T7F et T7R sont des amorces universelles qui sont positionnées sur les vecteurs pET; ^B: les amorces CdBin1113R et CdBin2379F se positionnent à l'intérieur du fragment *binIII* (cette séquence est également présente dans les inserts *binI*, *binII*)

Conditions générales de PCR :

MgCl ₂	2 mM
dNTPs	200 µM
Taq:Pfu (15:1)	2 U/50µl
Amorces	0.4 µM

Programme PCR de 30 cycles (appareil GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) :

Dénaturation	20 secondes à 94°C
Hybridation	45 secondes à 43°C
Élongation	2 minutes à 72°C